

# INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde  
der Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät  
der Ruprecht-Karls-Universität  
Heidelberg

vorgelegt von  
Anika Elke Maria Simon, M.Sc.  
aus Mannheim  
Tag der mündlichen Prüfung: 21.09.2016

# Untersuchung des Einflusses von Peroxiredoxin 1 auf die Migration von Gliomzellen als möglichen neuen Therapieansatz

Gutachter: PD Dr. Tobias P. Dick

Dr. Björn Tews



In Gedenken an meinen Opa  
Ludwig Schmitt



**Eidesstattliche Versicherung gemäß § 8 der Promotionsordnung für die  
Naturwissenschaftlich-Mathematische Gesamtfakultät der Universität Heidelberg / Sworn  
Affidavit according to § 8 of the doctoral degree regulations of the Combined Faculty of  
Natural Sciences and Mathematics**

1. Bei der eingereichten Dissertation zu dem Thema / *The thesis I have submitted entitled*

.....

handelt es sich um meine eigenständig erbrachte Leistung / *is my own work.*

2. Ich habe nur die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und mich keiner unzulässigen Hilfe Dritter bedient. Insbesondere habe ich wörtlich oder sinngemäß aus anderen Werken übernommene Inhalte als solche kenntlich gemacht. / *I have only used the sources indicated and have not made unauthorised use of services of a third party. Where the work of others has been quoted or reproduced, the source is always given.*

3. Die Arbeit oder Teile davon habe ich wie folgt/bislang nicht<sup>1)</sup> an einer Hochschule des In- oder Auslands als Bestandteil einer Prüfungs- oder Qualifikationsleistung vorgelegt. / *I have not yet/have already<sup>1)</sup> presented this thesis or parts thereof to a university as part of an examination or degree.*

Titel der Arbeit / *Title of the thesis:*.....

Hochschule und Jahr / *University and year:*.....

Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung / *Type of examination or degree:*.....

4. Die Richtigkeit der vorstehenden Erklärungen bestätige ich. / *I confirm that the declarations made above are correct.*
5. Die Bedeutung der eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unrichtigen oder unvollständigen eidesstattlichen Versicherung sind mir bekannt. / *I am aware of the importance of a sworn affidavit and the criminal prosecution in case of a false or incomplete affidavit*

Ich versichere an Eides statt, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit erkläre und nichts verschwiegen habe. / *I affirm that the above is the absolute truth to the best of my knowledge and that I have not concealed anything.*

.....  
Ort und Datum / *Place and date*

.....  
Unterschrift / *Signature*

<sup>1)</sup> Nicht Zutreffendes streichen. Bei Bejahung sind anzugeben: der Titel der andernorts vorgelegten Arbeit, die Hochschule, das Jahr der Vorlage und die Art der Prüfungs- oder Qualifikationsleistung. / *Please cross out what is not applicable. If applicable, please provide: the title of the thesis that was presented elsewhere, the name of the university, the year of presentation and the type of examination or degree.*

*The German text is legally binding.*

## Mein herzlicher Dank gilt:

An erster Stelle *meinen Eltern*, die mir durch ihre Förderung erst meinen Lebensweg und diese Arbeit ermöglicht haben.

Selbstverständlich danke ich *Dr. Björn Tews*, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit gegeben hat, diese Arbeit durchzuführen und dieses spannende Thema überlassen hat. Er stand jeder Zeit mit seiner Diskussions- und Hilfsbereitschaft zur Verfügung und führte diese Arbeit so auf den entscheidenden Weg.

Ich danke *PD Dr. Tobias Dick*, der nicht nur ein Mitglied meines TAC Komitees war, sondern auch durch Ideenreichtum und selbstverständliche Hilfe durch sich und seiner Arbeitsgruppe meine Arbeit weitergebracht hat.

Im Besondern gilt mein Dank *Daria Ezerina, Benjamin Stottmeier* und *Dr. Mirko Sobotta*, die jederzeit ein offenes Ohr für Fragen hatten und gerne bei Versuchen geholfen haben, die nicht in unserem Labor durch zu führen waren.

Des Weiteren gilt mein Dank *Prof. Dr. Christel Herold-Mende*, die nicht nur als Mitglied meines TAC Komitees sondern auch durch die Bereitstellung von Zelllinien diese Arbeit entscheidend unterstützt hat. Ihr Ideenreichtum und die großartige Hilfe durch ihre Arbeitsgruppe haben diese Arbeit weitergebracht.

Besonders gilt mein Dank *Dr. Jennifer Lohr, Carmen Rapp* und *Steffen Dettling*.

Den *Mitgliedern des Tews-Lab* möchte ich ebenfalls danken. Alle Mitglieder des Labors haben diese Arbeit durch angeregte Diskussionen und ihre Hilfsbereitschaft gefördert. Des Weiteren möchte ich *Dr. Julia Bode* für ihre Unterstützung bei den Implantationsversuchen danken.

*Dr. Nicolas Dross* gilt mein Dank, da er einen großen Anteil an der Etablierung der organotypischen Hirnschnitte hatte. Die angeregten Gespräche über die Aufnahmen und Auswertungsmöglichkeiten der Schnitte waren oft voller Ideenreichtum und brachten die Arbeit ein Stück weiter.

*Delia Bucher* stand mir nicht nur während der Etablierung der Mikroskopie von lebenden Zellen zur Seite sondern wurde zu einer Freundin. In diesem Zusammenhang, möchte ich *Dr. Steeve Boulant* danken, dass er die Zusammenarbeit zwischen Delia und mir ermöglichte und förderte, indem er jeder Zeit für Diskussionen zur Verfügung stand.

Zusätzlich möchte *Dr. Stefan Pusch* danken, der nicht nur mit materiellen Güter wie Antikörpern oder Zelllinien diese Arbeit unterstützte, sondern auch zu jeder Zeit mit seiner Diskussions- und Hilfsbereitschaft zur Verfügung stand.

Natürlich gilt mein Dank ebenfalls allen *Tierpflegern*, die sich um die Tiere kümmerten. Im Besonderen gilt mein Dank aber *Anette*, die auch wenn sie im Stress war immer Zeit für ein kurzes Gespräch hatte.

Zuletzt möchte ich *Boris Dorschel* dafür danken, dass er jeder Zeit für mich da war und mich unterstützt hat.

## Abkürzungsverzeichnis

	°C	Grad Celsius
	%	Prozent
	% (v/v)	Volumenprozent pro Volumen
	% (w/v)	Gewichtsprozent pro Volumen
	1-Cys PRDX	1-Cystein PRDX
	2-Cys PRDX	2-Cystein PRDX
	2-HG	2-Hydroxygluterat
	5'UTR	5' untranslatierten Bereich
	ε	Primereffizienz
	µg	Mikrogramm
	µl	Mikroliter
	µm	Mikrometer
	µm <sup>2</sup>	Quadratmikrometer
	µM	Mikromolar
<b>A</b>	Abb	Abbildung
	ABC Transporter	Transporter basieren auf einer ATP Bindungskassette
	Ade	Adenanthin
	ADP	Adenosindiphosphat
	AKT2	<i>V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene Homolog 2</i>
	APS	Ammoniumpersulfat
	ASK1	Apoptosesignalregulierende Kinase 1
	ATP	Adenosintriphosphat
<b>B</b>	Bax	<i>Bcl-2-associated X Protein</i>
	Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
	bFGF	Basis Fibroblastenwachstumsfaktor
	BSA	Rinderalbumin
<b>C</b>	C	Zirkularität
	c-Abl	<i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
	c-Met	Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor
	Calcein-AM	Acetoxymethylester von Calcein
	Cdc	<i>Cell divison control protein</i>
	Cdc42	<i>Cell divison control protein 42 homolog</i>
	CDKN2C	<i>Cyclin-dependent Kinase Inhibitor 2C</i>
	cDNA	Komplementäre DNA
	CED	<i>Convection enhanced delivery</i>

	CGH	vergleichende genomische Hybridisierungsanalyse
	CHI3L	<i>Chitinase 3-like Protein</i>
	CIMP	CpG Insel Methylierungsphänotyp
	CITED4	<i>Cbp/p300-interacting transactivator, with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain 4</i>
	cm	Zentimeter
	CMV	Cytomegalovirus
	CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
	Cp	Schwellenwert zum Eintritt in die log-lineare Phase der Reaktion
	CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanin
	Ctv-a	Der t-va Rezeptor wird unter dem Promotor der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase exprimiert und ist spezifisch für die Bildung von Oligodendroglomen
	Cys-SO <sub>2</sub> H	Sulfinsäurederivat
	Cys-SO <sub>3</sub> H	Sulfinsäurederivat
	Cys-S <sub>p</sub> H	Peroxidatives Cysteine
	Cys-S <sub>p</sub> OH	Sulfensäure gebunden am Cystein
	Cys-S <sub>R</sub> H	Reduzierendes Cystein
	Cys52	Cystein an Position 52 einer Aminosäuresequenz
	Cys83	Cystein an Position 83 einer Aminosäuresequenz
	Cys173	Cystein an Position 173 einer Aminosäuresequenz
<b>D</b>	DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
	ddH <sub>2</sub> O	Reinstwasser
	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
	DMEM F12	Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
<b>E</b>	E. coli	<i>Escherichia coli</i>
	E6-AP	Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP
	EAE	Experimentelle Autoimmunencephalitis
	EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
	ECM	Extrazelluläre Matrix
	EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
	eEF2	<i>Eukaryotic elongation factor 2</i>
	EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
	EGFR	Epidermale Wachstumsfaktorrezeptor

	EGFRvIII	EGFR Variante III
	EMP3	<i>Epithelial Membrane Protein 3</i>
	ERBB-3	<i>Receptor Tyrosine-protein kinase erbB-3</i>
<b>F</b>	FAK	Fokaladhäsionskinase
	FBS	Fötales Kälberserum
	FBXO3	F-Box Protein 3
	FGFR3	Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor 3
	FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
	Fwd	DNA-Sequenzen des Sinnstrangs
<b>G</b>	g	Gramm
	G-Actin	Monomeres Actin
	GABRB2	<i>Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor Beta 2</i>
	GFAP	Saures Gliaprotein
	GFP	Grün fluoreszierendes Protein
	Gtv-a	Der tv-a Rezeptor wird in GFAP exprimierenden Zellen gebildet und führt nach entsprechender Infektion zu Astrozytomen
<b>H</b>	h	Stunde
	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
	H <sub>2</sub> O	Wasser
	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
	HRP	Meerrettichperoxidase
	HSP27	<i>Heat shock protein 27</i>
<b>I</b>	IDH1	Isocitratdehydrogenase 1
	IGF	Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1
	IgG	Immunglobulin G
	IKK $\beta$	<i>IkappaB Kinase <math>\beta</math></i>
	ILR4	Interleukin 4 Rezeptor
<b>J</b>		
<b>K</b>	kb	Kilobasenpaare
	KCl	Kaliumchlorid
	kDa	Kilo-Dalton
<b>L</b>	LB	<i>Lysogeny Broth</i>
	LIMK	LIM Kinase
	LOH 1p/19q	Verlust der Heterozygotität der Chromosomenarme 1p und 19q
<b>M</b>	M	Konzentration in Mol
	MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinasen
	MAPK14	Name des Gens für p38 MAPK

MAPKAPK2	MAP Kinaseaktivierte Proteinkinase 2
MBP	Basisches Myelinprotein
MEF	Mausfibroblast
MEM	<i>Minimal Essential Medium</i>
MgCl	Magnesiumchlorid
MGMT	O <sup>6</sup> -Methylguanin-DNA-Methyltransferase
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
MHC1	Haupthistokompatibilitätskomplex 1
min	Minute
miRNA	Mikro-RNA
MK2	MAP Kinaseaktivierte Proteinkinase 2
MKK3/6	Mitogenaktivierten Proteinkinasen Kinase 3 und 6
MKP-5	Mitogenaktivierte Proteinkinase Phosphatase 5
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
MMP	Matrixmetalloprotease
MNNG	Methylnitronitrosoguanidine
mRNA	<i>Messenger</i> -RNA oder Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
<b>N</b> N	DNA-Menge bei qPCR
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	Natriumorthovanadat
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NADP	Nicotinamidadenindinukleotid
NaF	Natriumfluorid
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
NF1	Neurofibromin 1
NFκB	<i>Nuclear Factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
ng	Nanogramm
NgR	Nogo-A Rezeptors
NKX2-2	<i>NK2 Homeobox 2</i>
nm	Nanometer
Nrf2	<i>Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Related Factor 2</i>
Ntv-a	Der t-va Rezeptor wird unter der Kontrolle von dem Nestin Promotor exprimiert und ist spezifisch für neuronale und gliale Stammzellen

<b>O</b>	OD	Optische Dichte
	Olig2	<i>Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2</i>
<b>P</b>	P	Phosphatrest
	P/S	Penicillin und Streptomycin
	P-gp	P-Glycoprotein
	p-p38 MAPK	phosphorylierte p38 MAPK
	p190RhoGAP	<i>Glucocorticoid Receptor DNA Binding Factor 1</i>
	p38 <sup>KD</sup>	Reduktion von p38 MAPK
	p38 MAPK	p38 mitogenaktivierte Proteinkinase
	PARP-1	Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1
	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
	PBS-T	PBS mit 0.05% Tween20
	PCR	Polymerasekettenreaktion
	PDGFβ	Wachstumsfaktor aus Blutplättchen und embryonalem Bindegewebe ( <i>Platelet-derived growth factor β</i> )
	PDGFA	<i>Platelet-Derived Growth Factor A</i>
	PDGFR	<i>Platelet-derived Growth Factor</i> Rezeptor
	PEI	Polyethylenimin
	PFA	Paraformaldehyd
	PGK	Phosphoglyzeratkinase
	pmol	Picomolar
	PNS	Peripheres Nervensystem
	PRDX	Peroxiredoxin
	PRDX1	Peroxiredoxin 1
	PRDX1 <sup>C52S</sup>	PRDX1 mit ausgetauschter Aminosäure an Position 52 (Cystein zu Serin)
	PRDX1 <sup>C83S</sup>	PRDX1 mit ausgetauschter Aminosäure an Position 83 (Cystein zu Serin)
	PRDX1 <sup>C173S</sup>	PRDX1 mit ausgetauschter Aminosäure an Position 173 (Cystein zu Serin)
	PRDX1 <sup>KD</sup>	Reduktion der PRDX1 Expression
	PRDX1 <sup>Res</sup>	Wiederherstellung der PRDX1 Expression
	PRDX1 <sup>WT</sup>	PRDX1 ohne Mutation
	PRDX2	Peroxiredoxin 2
	PRDX3	Peroxiredoxin 3
	PRDX4	Peroxiredoxin 4
	PRDX5	Peroxiredoxin 5



	PRDX6	Peroxiredoxin 6
	PRX	PRDX
	PTEN	<i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
	PTP-PEST	Protein Tyrosinphosphatase mit PEST Motiv
	PVDF	Polyvinylidenfluorid
<b>Q</b>	qPCR	quantitative <i>real-time</i> PCR
<b>R</b>	R	Rest
	Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
	RCAS	Aviärer Virus, der an den tv-a Rezeptor bindet
	RELB	V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B
	Rev	DANN-Sequenzen des Komplementärstrangs
	RhoA	<i>Ras homolog gene family, member A</i>
	RNA	Ribonukleinsäure
	ROS	Reaktiven Sauerstoffverbindungen
	rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
	RTCA	<i>Realtime Cell Analysis</i>
<b>S</b>	s	Sekunde
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
	shRNA	<i>small hairpin</i> RNA
	SNCG	<i>Synuclein Gamma</i>
	SOB	<i>Super Optimal Broth</i>
	SOX2	<i>Sex Determining Region Y Box 2</i>
	Src	<i>Proto-oncogene Tyrosine-protein Kinase</i>
	Srx	Sulfiredoxin
<b>T</b>	t-va Rezeptor	Aviärer Rezeptor
	TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
	TBS-T	TBS mit 0.1% Tween20
	TEMED	Tetramethylethylendiamin
	TGFβ1	<i>Transforming Growth Factor β1</i>
	TLR2	Toll-like-Rezeptor 2
	TLR4	Toll-like-Rezeptor 4
	TMZ	Temozolomid
	TP53	Tumorprotein 53
	TP73	Tumorprotein 73
	TRADD	<i>Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-associated DEATH domain Protein</i>

	Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
	Trx	Thioredoxin
	TS	Tumorsphäre
<b>U</b>	UV	Ultraviolett
<b>V</b>	VEGFR	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> Rezeptor
<b>W</b>	WASP	Wiskott-Aldrich Syndromprotein
	WAVE	<i>WASP-family verprolin-homologouse protein</i>
	WHO	Weltgesundheitsorganisation
<b>X</b>	XFM	Ntv-a Mäuse mit einem zusätzlichen Verlust des Ink4/ARF Lokus
<b>Y</b>		
<b>Z</b>	ZNS	Zentrales Nervensystem

### Grundlegende Definitionen

- *In vitro* heißt wörtlich übersetzt „im Glas“ und steht in Naturwissenschaften für Experimente, die in einer kontrollierten Umgebung außerhalb des Gesamtorganismus durchgeführt werden. In dieser Arbeit bezieht sich *in vitro* auf Experimente, die in der Zellkultur durchgeführt wurden.
- *Ex vivo* bedeutet wörtlich „außerhalb des Lebendigen“ und steht im Rahmen dieser Arbeit für die Experimente, die auf der natürlichen Umgebung von Gliomzellen, dem Gehirn, durchgeführt wurden, jedoch nicht im lebenden Tier. Hierbei handelt es sich um die Verwendung von organotypischen Gehirnschnitten für die Untersuchung von Zellmigration.
- *In vivo* heißt „im Lebendigen“ und bezieht sich auf die Experimente die im lebenden Tier durchgeführt wurden.
- Der in der Nukleinsäureanalytik gebräuchliche Begriff *Primer* für kurze Oligodesoxyribonukleotidsequenzen stammt zwar aus dem Englischen, ist aber auch im Deutschen üblich geworden. Dementsprechend wird dieser Begriff in dieser Arbeit durchgehend verwendet.
- Als Abkürzung für die Desoxyribonukleinsäure wird das aus dem Englischen stammende und mittlerweile im Deutschen gebräuchliche DNA verwendet.
- Bei *Well* Platten handelt es sich um in der Zellkultur häufig verwendete Platten mit mehreren Vertiefungen (*Wells*), in denen die Zellen kultiviert werden können.
- Der *Cell index* ist ein Wert, der auf der Impedanzmessung basiert und von dem RTCA DP System errechnet wird. Die Impedanz an den Elektroden vergrößert sich durch adhärierende Zellen, die sich auf der Elektrode absetzen. Der *Cell index* wird dabei durch die Differenz von dem Impedanzwert an einem bestimmten Zeitpunkt und des Kontrollimpedanzwertes ohne Zellen errechnet:

$$Cell\ index = Impedanz_{Zeitpunkt\ x} - Impedanz_{Zeitpunkt\ 0}$$

Je mehr Zellen sich auf der Elektrode absetzten, desto größer wird der Impedanzwert, sodass gilt: Je mehr Zellen, desto höher der *Cell index*.

- In dieser Arbeit werden die Veränderungen der Genexpression durch lentiviral eingebrachte shRNAs oder Genkonstrukten wie folgt bezeichnet:
  - *Knockdown* (<sup>KD</sup>) – Reduktion der Genexpression mittels shRNA
  - *Restoration* (<sup>Res</sup>) – Wiedereinbringen eines fehlendes Gens wie zum Beispiel PRDX1 in die NCH1681 Zellen
- Als Trennzeichen für Dezimalzahlen wird der Punkt verwendet.
- Begriffe, die nicht ursprünglich aus dem Deutschen stammen, jedoch auch im Deutschen üblich geworden sind, werden in dieser Arbeit kursiv geschrieben.
- Abgekürzte Gennamen werden kursiv geschrieben

## Inhaltsverzeichnis

	Seiten
<b>Erklärung</b>	IV
<b>Danksagung</b>	V
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	VI-XII
<b>Grundlegende Definitionen</b>	XIII-XIV
<b>Inhaltsverzeichnis</b>	XV-XVIII
<b>Zusammenfassung</b>	1
<b>Abstract</b>	2
<b>1. Einleitung</b>	3-23
1.1 Zentrales Nervensystem	3
1.2 Tumore des ZNS	3
1.3 Gliome	4-10
1.3.1 Migration und Invasion der Gliomzellen	4-6
1.3.2 Einteilung der Gliome	6-9
1.4 LOH 1p/19q	10-11
1.5 Peroxiredoxine (PRDX)	11-14
1.5.1 Typische 2-Cys PRDX Enzyme	12
1.5.2 Atypische 2-Cys PRDX Enzyme	12
1.5.3 1-Cys PRDX Enzyme	13
1.6 PRDX1	14-15
1.7 Therapie von Gliomen	15-17
1.7.1 Chemotherapie mit TMZ	15-16
1.7.2 Neue Therapieansätze	16-17
1.8 Molekulare Grundlagen der Zellbewegung	17-23
1.8.1 Umbau des Actin Zytoskeletts	18
1.8.2 Actin Polymerisation	18-20
1.8.3 Formation von Fokaladhäsionen	20-22
1.9 p38 MAPK Signalweg	22-23
<b>2. Zielsetzung der Arbeit</b>	24
<b>3. Material</b>	25-30
3.1 Verwendete Apparaturen, Reagenzien und Hilfsmittel	25-30

3.2 Puffer	30
<b>4. Methoden</b>	<b>31-54</b>
4.1 Zellkultursysteme	31-32
4.2 Modulation der Proteinexpression	32-38
4.2.1 Reduktion der Genexpression durch shRNAs	33-34
4.2.2 Expression von PRDX1	34
4.2.3 Expression verschiedener PRDX1 Varianten	34-36
4.2.4 Ligation von DNA Sequenzen	36
4.2.5 Transformation von Plasmiden in <i>E.coli</i>	37
4.2.6 Produktion der Lentiviren	37-38
4.3 Bestimmung der Zellviabilität und Proliferation	38-39
4.3.1 <i>CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay</i>	38
4.3.2 Proliferationsanalyse	39
4.4 Expressionsanalyse von Genen mittels qPCR	39-42
4.4.1 Isolierung und Reinigung der RNA aus Zellpellets	39
4.4.2 Synthese der cDNA aus mRNA	40
4.4.3 Bestimmung der mRNA Menge durch qPCR	40-41
4.4.4 Primersysteme für die qPCR	41-42
4.5 Analyse der Proteinexpressionsleveln	42-44
4.5.1 Isolation von Proteinen aus Zellpellets	42-43
4.5.2 SDS-PAGE	43
4.5.3 <i>Western Blot</i>	43-44
4.5.4 Antikörper zu Detektion	44
4.6 Bestimmung der Anzahl der PRDX1 Allele	45
4.6.1 qPCR basierter Nachweis der Anzahl von Allelen	45
4.6.2 Primersysteme	45
4.7 Migration von Gliomzellen	46-47
4.7.1 Untersuchung der Motilität ( <i>Scratch Assay</i> )	46
4.7.2 <i>Boyden Chamber</i> Migrationsversuch	46-47
4.8 Infiltration von Gliomzellen	47-48
4.8.1 <i>Boyden Chamber</i> Versuch	47
4.8.2 Infiltrationsanalyse durch RTCA	47-48
4.9 Immunfluoreszenzfärbung von Gliomzellen	48-49
4.9.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung	48
4.9.2 Färbung des Actin Zytoskeletts	48-49
4.9.3 Primärantikörper für Immunfluoreszenz	49

4.9.4 Fluorophor gekoppelte Sekundärantikörper	49
4.10 Analyse des Actin Zytoskeletts und Fokaladhäsionen	50-51
4.10.1 Untersuchung der Dynamik des Actin Zytoskeletts	50
4.10.2 Untersuchung der Dynamik der Fokaladhäsionen	50-51
4.11 <i>In vivo</i> Untersuchungen	51-53
4.11.1 Implantation von Hs683 Gliomzellen	51
4.11.2 Immunhistochemische Färbung der Gehirnschnitte	51-52
4.11.3 Antikörper für immunhistochemische Färbung	52
4.11.4 Fluorophore gekoppelte Sekundärantikörper	52
4.12 Isolation von Neuronen aus dem Cerebellum von Mäusen	52-53
4.13 Behandlung von Gliomzellen mit verschiedenen Substanzen	53
4.13.1 TMZ	54
4.13.2 Anisomycin	54
4.13.3 SB203580	54
4.13.4 Ade	54
<b>5. Ergebnisse</b>	54-93
5.1 Charakterisierung der verwendeten Gliomzellen im Bezug auf PRDX1	54-56
5.2 Der Verlust von PRDX1 beeinflusst die Proliferaton und Viabilität von Gliomzellen negativ und erhöht die Sensitivität gegenüber TMZ	57-58
5.3 Die Aktivierung von p38 MAPK und dessen Signalweg wird in Gliomzellen durch PRDX1 beeinflusst	59-62
5.4 PRDX1 reguliert die Motilität von Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK	63
5.5 PRDX1 reguliert die Migration von Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK	64-66
5.6 PRDX1 reguliert die Infiltration der Gliomzellen in drei dimensionale Matrices über die Aktivierung von p38 MAPK	66-74
5.7 Der Verlust von PRDX1 reguliert die Zellmorphologie von Gliomzellen über die Modulierung des Actin Zytoskeletts	72-77
5.8 PRDX1 moduliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen über die Regulation der Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs	77-82
5.9 PRDX1 reguliert die Motilität von Gliomzellen unabhängig von dessen Peroxidaseaktivität	82-86
5.10 PRDX1 – ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Behandlung von Patienten mit Gliomen	87-93

<b>6. Diskussion</b>	94-123
6.1 Modulation der Genexpression in Gliomzellen	94-96
6.2 Untersuchung niedergradiger Gliomzellen im Hinblick auf den LOH 1p/19q	96
6.3 Der Verlust von PRDX1 erhöht die Sensitivität gegenüber TMZ	96-97
6.4 Die Proliferation von Gliomzellen scheint ein PRDX1 unabhängig zu sein	97-98
6.5 PRDX1 reguliert die Migration und Infiltration der Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK	93-
6.5.1 PRDX1 reguliert die Aktivität von p38 MAPK	93-100
6.5.2 Die Morphologie der Gliomzellen ist abhängig von der PRDX1 gesteuerten Aktivierung von p38 MAPK	100-96
6.5.3 PRDX1 reguliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen in Abhängigkeit von p38 MAPK und beeinflusst die Migration der Gliomzellen	101-104
6.5.4 Migration von Gliomzellen in einer 3D Matrix	104-108
6.6 Implantation von PRDX1 modulierten Zellen in NOD/SCID/γ Mäuse	108-110
6.7 PRDX1 aktiviert p38 MAPK unabhängig von seiner Peroxidaseaktivität	110-113
6.8 Ist die Inhibition von PRDX1 ein möglicher Therapieansatz?	113-117
6.8.1 Die Inhibition von PRDX1 erhöht die Sensitivität von Gliomzellen auf die Behandlung mit TMZ	113
6.8.2 Durch die Inhibition von PRDX1 wird die Migrationsfähigkeit der Gliomzellen reduziert	114-115
6.8.3 Die Behandlung von Gliomzellen mit Ade spiegelt die Morphologie der PRDX1 Reduktion wider	115
6.8.4 Ade reguliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen durch Inhibition der Chaperonfunktion von PRDX1	116-117
<b>7. Referenzen</b>	124-145
<b>Anhänge</b>	146-147
<b>Wissenschaftliche Beiträge</b>	148



### **Zusammenfassung**

Gliome stellen durch ihr infiltrierendes Wachstum bis heute eine therapeutische Herausforderung dar. Trotz intensiver Forschung gelang es bislang nicht einen therapeutischen Ansatz zu finden, der die Überlebensdauer deutlich verlängern konnte. Dementsprechend besteht weiterhin der Bedarf an wirksamen Therapien und Kombinationen von Therapien. Der Erfolg von den zur Zeit verwendeten Therapien mit zum Beispiel Temozolomid (TMZ) hängt maßgeblich von den prognostischen Markern der Gliomen ab. Der Verlust des Chromosomenarm 1p durch den Verlust der Heterozygotität der Chromosomenarme 1p und 19p (LOH 1p/19q) oder dem einfachen LOH 1p zählt zu diesen prognostischen Markern und führt zu einem deutlich längeren Überleben der betroffenen Patienten. Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*) ist auf dem Chromosomenarm 1p (1p34.1) codiert und wurde als funktioneller Marker für die TMZ Sensitivität *in vitro* identifiziert. Der Einfluss von prognostischen Markern wurde hauptsächlich auf das Überleben von Patienten und die Sensitivität der Gliomzellen auf die Therapieformen untersucht, jedoch nicht auf die Migration der Zellen. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von *PRDX1* auf die Migrationsfähigkeit von Gliomzellen untersucht.

In dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Reduktion von *PRDX1* zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber TMZ führt. Auf die Migrationsfähigkeit wirkte sich die Reduktion von *PRDX1* *in vitro* und *ex vivo* inhibierend aus. Es konnte nachgewiesen werden, dass der Effekt von *PRDX1* auf die Migration durch die Regulation der Phosphorylierung von der p38 mitogenaktivierte Proteinkinase (p38 MAPK) getragen wird. Die Reduktion von *PRDX1* führt zu einer geringeren Menge an phosphoryliertem p38 MAPK, welches den dynamischen Umbau von Actinfilamenten und Fokaladhäsionen steuert. Es konnte hier gezeigt werden, dass in Gliomzellen die Regulation der Migration und der Dynamik des Actin Zytoskeletts so wie der Fokaladhäsionen abhängig von der Chaperonfunktion von *PRDX1* ist.

Dieser Regulationsmechanismus gab den Hinweis, dass die Inhibition von *PRDX1* als in Erweiterung der Standardtherapie möglich wäre. Adenanthin (Ade) ist ein pflanzliches Diperten, welches an die funktionellen Cysteine von *PRDX1* bindet und so die Funktionen von *PRDX1* blockiert. Die Inhibition von *PRDX1* konnte die Ergebnisse der Reduktion desselben nachahmen, sodass für alle Gliome in denen die Expression von *PRDX1* nicht reduziert ist dessen Inhibition eventuell einen prognostischen Vorteil bieten könnte. Hierfür ist jedoch noch weitere Forschung notwendig, um die Bereitstellung von Ade im Gehirn zu verbessern bzw. zu ermöglichen.

### Abstract

Gliomas are highly invasive brain tumors, with a poor prognosis for patients. Despite intensive research the current treatment of gliomas can prolong overall survival only a couple of month. This indicates that finding a new therapy or combination of therapies is getting to the focus of research. The responsiveness of gliomas facing treatment with temozolomide (TMZ) depends mainly on prognostic markers expressed in glioma cells. The loss of heterozygosity of chromosomal arm 1p and 19q (LOH 1p/19q) or the single loss of 1p belongs to these prognostic markers, which correlates with a better survival of the patients. Peroxiredoxin 1 (*PRDX1*) was identified as functional marker located on chromosomal arm 1p (1p34.1) and was identified as functional marker for the sensitivity towards TMZ treatment *in vitro*. Nevertheless, the influence of prognostic markers was analyzed for overall survival of patients and their sensitivity to the treatments, but not for glioma cell migration. This work was investigating the influence of PRDX1 on glioma cell migration.

This work could verify former results, that the knockdown of PRDX1 (PRDX1<sup>KD</sup>) increases sensitivity to TMZ. Further it was identified that the PRDX1<sup>KD</sup> reduces migration of glioma cells *in vitro* and *ex vivo*. It could be observed that PRDX1 regulates glioma cells migration via phosphorylation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK). PRDX1<sup>KD</sup> cells show a reduced phosphorylation of p38 MAPK, which is responsible for the dynamic of actin filaments and focal adhesions as well as cell migration. The essential function of PRDX1 to regulate cell migration and dynamic of actin cytoskeleton is its chaperone activity.

This regulatory mechanism indicates that inhibition of PRDX1 could serve as a novel target in glioma treatment in addition to the current therapy protocol. Adenanthin is a plant-derived diterpenoid that binds to the functional cysteines of PRDX1 and inhibits therefore the functions of PRDX1. Blocking PRDX1 could resemble the results for the knockdown of PRDX1 in glioma cells. Therefore, the inhibition of PRDX1 might be able to introduce a prognostic advantage for glioma patients without the loss of PRDX1 expression. However, it requires more research in order to improve the delivery of Ade to the brain tissue, as Ade is not able to cross the blood-brain-barrier.

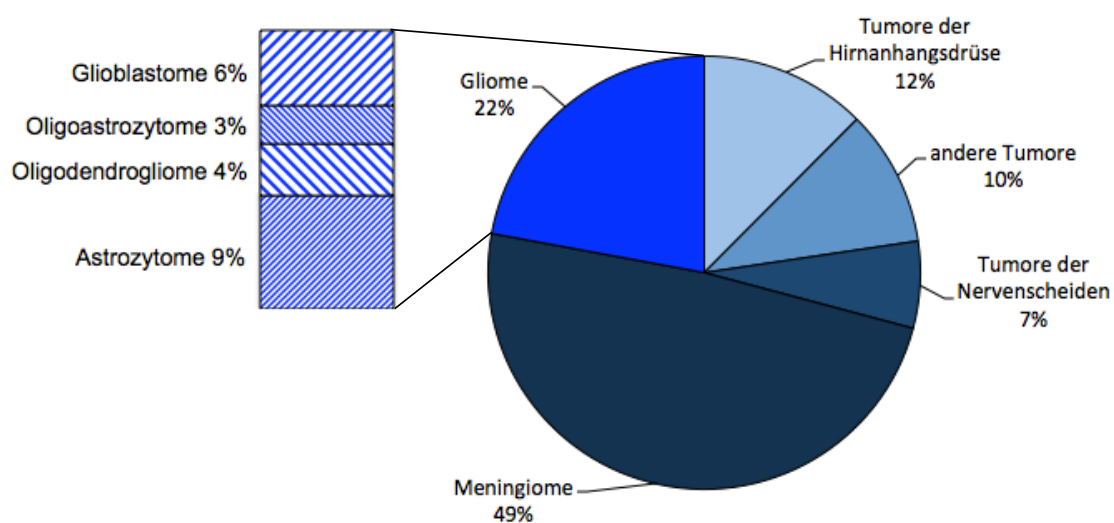
## 1. Einleitung

### 1.1 Zentrales Nervensystem (ZNS)

Das ZNS entsteht entwicklungsbiologisch aus dem embryonalen Neuralrohr, das aus dem Ektoderm -genauer dem Neuroektoderm- gebildet wird. Zu dem ZNS der Wirbeltiere wird das Gehirn sowie das Rückenmark gezählt, wobei der Übergang in das periphere Nervensystem (PNS) fließend erscheint, da einige Zellausläufer des ZNS in das PNS über geht. Ein prominenter Unterschied zwischen ZNS und PNS stellt die Ummantelung der Axone dar. Die Axone des ZNS werden von Oligodendrozyten ummantelt, während die des PNS von Schwann-Zellen umhüllt sind. Das ZNS unterteilt sich in die graue Substanz (*Substantia grisea*) und die weiße Substanz (*Substantia alba*). Diese Einteilung entstand durch den makroskopisch erkennbaren Aufbau des ZNS. Die Zellkörper der Neurone befinden sich in der *Substantia grisea*, während die Axone die *Substantia alba* bilden. [1]

### 1.2 Tumore des ZNS

Tumore des ZNS sind Tumore, die aus neuroektodermalen Gewebe im ZNS entstehen. Eine Untergruppe davon stellen die Gehirntumore dar. Die Aufzeichnungen des Zentralen Hirntumorregisters der USA über neu entstandene Gehirntumore zeigten für die Jahre 2008 bis 2012, dass Gliome mit 22% neben den Meningiomen eine der Hauptgruppen bilden und mit 80% den Hauptanteil an malignen Tumoren des ZNS haben (<http://www.cbtrus.org>). Die Unterteilung der Gliome zeigt eine gleichmäßige Aufteilung in die verschiedenen Untergruppen (Abb. 1).



**Abb. 1: Verteilung der neudiagnostizierten Tumore des ZNS zwischen 2008 und 2012.** Gliome machen dabei 22% aller Tumore des ZNS aus und bilden so die zweitgrößte Gruppe (CBTRUS, 2016).

### 1.3 Gliome

Gliome entstehen aus den Stützzellen des ZNS, wobei es weiterhin unklar ist ob die Tumore aus Oligodendrozyten und Astrozyten oder aus deren Vorläuferzellen entstehen [2-4]. Den Gliomen kommt eine gesonderte Rolle im Feld der Tumore des ZNS zu, da sie durch ein diffuses infiltrierendes Wachstum eine therapeutische Herausforderung darstellen. Neben Radio- und Chemotherapie [5] wird die chirurgische Resektion des Tumors zur Zeit als Standardtherapie durchgeführt. Jedoch verbleiben dabei infiltrierte Tumorzellen im Gehirngewebe zurück, die häufig resistent gegen die angewendeten Radio- und Chemotherapien sind [6] und zu einem Rezidiv führen [7]. Im Hinblick auf das Überleben der Patienten ab dem Zeitpunkt der Diagnose gibt es deutliche Unterschiede zwischen den Gliomarten. Die schlechteste Prognose haben dabei die hochgradigen Glioblastome mit einer durchschnittlichen Überlebensdauer von 12 Monaten ab Diagnosezeitpunkt [8, 9], während die weniger hochgradigen Gliome mit einer besseren Prognose einhergehen. Hierbei wird die beste Prognose den Oligodendrogliomen mit über 10 Jahren zugeschrieben [10]. Eine erfolgreiche Therapie, die das Überleben der Patienten deutlich verlängert, konnte bisher noch nicht gefunden werden [11]. In den folgenden Kapiteln werden die wichtigsten Eigenschaften von Gliomen beschrieben, die vor allem für das Ansprechen der Therapie ausschlaggebend sind.

#### 1.3.1 Migration und Invasion der Gliomzellen

Ein Kennzeichen der Gliome ist das diffus infiltrierende Wachstum. Die Migration von Gliomzellen kann in drei verschiedene Kategorien unterteilt werden: Einzelzellmigration, Wanderung als Kette von Zellen und die kollektive Wanderung. Je nach Determinierung durch extrazelluläre Signale kann die Bewegung dabei entweder mesenchymal oder amoeboid sein [12]. Die amoeboiden Bewegung gleicht einem Gleiten bei dem die extrazelluläre Matrix (ECM) nicht verändert wird [13, 14]. Die mesenchymale Bewegung unterliegt einem komplexeren Mechanismus, bei dem die Zellen zunächst polarisiert werden und Zellfortsätze ausbilden. Sobald die Zellfortsätze stabilisiert sind, wird das hintere Ende der Zelle abgelöst und nachgezogen [15]. Die Invasion wird dabei durch den Umbau der ECM durch zum Beispiel Matrixmetalloproteasen (MMPs) gekennzeichnet [16, 17]. So konnte gezeigt werden, dass die Inhibition von MMPs die Invasion *in vitro* reduziert [11]. Im Unterschied zu der Einzelzellmigration entsteht bei der Bewegung als Kollektiv eine funktionelle Einheit aus den Zellen, die einheitlich wandert [18, 19]. Hierbei folgen die Zellen einem Pfad, der zum Beispiel durch den Umbau der ECM oder die Pseudopodien von schneller migrierenden Zellen gebildet wird [18, 20]. Die Migration bzw. Invasion der Gliomzellen wird über Cytokine gerichtet [21-23], die von

Nachbarzellen oder den Blutgefäßen ausgeschüttet werden [24, 25] und einen Gradienten im Gewebe ausbilden [26, 27]. Das Signal der Cytokine wird über Transmembranrezeptoren in das Zellinnere übertragen und reguliert so die Motilität [25]. Zum Beispiel übertragen Integrine die Signale, die durch die Adhäsion an der ECM entstehen [28] und regulieren damit die Motilität der Zellen [29]. Des Weiteren spielt das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Motilität eine Rolle in der Regulation von der Migration [30]. *Transforming Growth Factor  $\beta$ 1* (TGF $\beta$ 1) wurde als Modulator dieses Gleichgewichts identifiziert, so erhöht TGF $\beta$ 1 die Motilität der Gliomzellen, verhindert gleichzeitig aber ihre Proliferation [31]. Die Interaktion zwischen Cytokinen und Transmembranrezeptoren wurde für anti-invasive Therapien in Betracht gezogen, um zum Beispiel die überexprimierten Rezeptoren wie der epidermale Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR), der Hepatozyten-Wachstumsfaktorrezeptor (c-Met), der *Platelet-derived Growth Factor* Rezeptor (PDGFR) und der *Vascular Endothelial Growth Factor* Rezeptor (VEGFR) zu inhibieren [32-35]. Im Gegensatz zu anderen Zelltypen wurde für Gliomzellen beschrieben, dass diese nicht nur über Blutgefäße oder die Meningen wandern, sondern auch die Faserbündel der *Substantia alba* als Migrationsweg nutzen können [36, 37]. Die verschiedenen Migrationswege werden in den folgenden Abschnitten näher beschrieben.

- Blutgefäße

Gliomzellen nutzen die Blutgefäße als Route für die Infiltration des Gehirns, ohne diese zu penetrieren [38]. Die Gliomzellen werden durch sekretierte Faktoren der Blutgefäße angezogen, wie zum Beispiel Bradykinin [39]. Die ECM, die durch die Blutgefäße generiert wird, enthält beispielsweise Laminin, Kollagene und Fibronectin [16, 40]. Die Migration entlang der Blutgefäße unterliegt zu meist der Regulation durch Integrine. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade der Integrine durch Antikörper die Invasion von Gliomzellen auf Kollagen Typ IV und Fibronectin verhindert [17, 41]. Integrine bilden bei dem Kontakt mit der ECM Heterodimere aus, die als Grundlage für die Formation von Fokaladhäsionen dienen [42]. Fokaladhäsionen aktivieren Proteine, die an der Modulation des Actin Zytoskeletts beteiligt sind wie die Fokaladhäsionskinase (FAK) [43, 44] oder mitogenaktivierte Proteinkinasen (MAPK) [45]. Diese Regulationsmechanismen der Fokaladhäsionen und des Actin Zytoskeletts sind essentiell für die Migration von Gliomzellen und werden unter Kapitel 1.8 genauer beschrieben.

- Subarachnoidraum

Gliomzellen verwenden zusätzlich den Subarachnoidraum zur Migration, jedoch wird dieser deutlich weniger genutzt als die Blutgefäße [46, 47]. Der Subarachnoidraum weist die gleichen Eigenschaften auf wie die ECM der Blutgefäße [16, 40] und fordert daher den gleichen Mechanismus, der für die Migration entlang der Blutgefäße nötig ist [17, 41].

- *Substantia alba*

Eine Besonderheit von Gliomzellen ist, dass sie über die Fasertrakte des Gehirns migrieren können, welche normalerweise durch das enthaltene Myelin eine hemmende Wirkung auf migrierende Zellen haben [48-51]. Es konnte zum Beispiel die Migration über das *Corpus callosum* in die andere Hemisphäre beobachtet werden [52, 53]. Diese Migration basiert jedoch nicht auf dem oben beschriebenen auf Integrinen beruhenden Mechanismus [54, 55]. Die genauen Mechanismen die es Gliomzellen ermöglichen dieser Inhibition zu entgehen, sind bisher jedoch noch unbekannt.

### 1.3.2 Einteilung der Gliome

Die bisherige Klassifizierung von Gliomen beruhte auf der histologischen Auswertung der Tumore und wurde entsprechend der Weltgesundheitsorganisation (WHO) in verschiedene Grade eingeteilt. Die WHO gliederte Gliome in drei Unterkategorien beruhend auf den enthaltenden Zelltypen – Oligodendrogliome, Astrozytome und die Mischform Oligoastrozytome – die alle dem WHO Grad II zugeordnet werden. Davon ausgehend ergaben sich die WHO Grad III Tumore, die anaplastischen Oligodendrogliome, anaplastische Astrozytome und anaplastische Oligoastrozytome. Zusätzlich können aus den anaplastischen Astrozytomen bzw. den anaplastischen Oligoastrozytomen WHO Grad IV Tumore entstehen, die sekundären Glioblastome. Glioblastome können jedoch auch ohne niedergradige Vorstufen entstehen, dabei handelt es sich um primäre Glioblastome. [56, 57] Jedoch ist durch die Etablierung der Expressionsanalysen ein Umbruch in dieser Einteilung zu erkennen. Auf Grund der Expressionsprofile der Gliome konnten vier Untergruppen definiert werden – Proneural, Neural, Klassisch und Mesenchymal [58]. In den folgenden Absätzen werden diese Untergruppen beschrieben.

- Proneurale Tumore

Die proneurale Untergruppe wird durch die Expression von Genen wie *Oligodendrocyte Lineage Transcription Factor 2 (Olig2)*, *NK2 Homeobox 2 (NKX2-2)*, *Receptor Tyrosine-protein kinase erbB-3 (ERBB3)* und *Sex Determining Region Y Box 2 (SOX2)* definiert. Zu dieser Untergruppe gehören hauptsächlich sekundäre Glioblastome und fast alle der niedergradigen Gliome [59]. Patienten die ein Gliom der proneuralen Untergruppe haben, sind zum Zeitpunkt der Diagnose meist jünger und haben eine länger durchschnittliche Überlebensdauer. Entsprechend der besseren Prognose tragen die Gliome der proneuralen Untergruppe häufig eine Mutation der Isocitratdehydrogenase 1 (IDH1), weisen einen Verlust der Heterozygotität der Chromosomenarme 1p und 19q (LOH 1p/19q) auf und gehören zu dem Cytosin-phosphatidyl-Guanin (CpG) Insel Methylierungsphänotyp (CIMP<sup>Pos</sup>). [58]

Die Mutation des *IDH1* Gens ist über die verschiedenen Gliomarten die am weitesten verbreitete Mutation [60, 61]. Die Mutation führt in dem aktiven Zentrum des IDH1 Proteins zu dem Austausch eines Argininrests gegen einen Histidinrest an der Aminosäure an Position 132 (R132H) [62, 63]. Durch diese Mutation erhält IDH1 eine zusätzliche enzymatische Funktion, sodass aus  $\alpha$ -Ketoglutarat ein neues Produkt synthetisiert wird – 2-Hydroxyglutarat (2-HG) [62]. 2-HG beeinflusst über Inhibition die Histon- und Desoxyribonukleinsäure (DNA) -Demethylasen epigenetische Regulationsmechanismen in Gliomzellen [63]. Studien konnten zeigen, dass die Mutation von IDH1 sich positiv auf die Überlebensdauer der Patienten auswirkt [60, 64-66].

Der LOH 1p/19q ist der Verlust von je einem Chromosomenarm 1p und 19q und wurde in Oligodendrogliomen nachgewiesen [67]. Der prognostische Marker LOH 1p/19q nimmt auf Grund des auf 1p codierten funktionellen Marker PRDX1 für diese Arbeit eine gesonderte Rolle ein und wird unter 1.4 genauer betrachtet. Aktuelle Studien zeigten, dass der LOH 1p/19q ein positiver prognostischer Marker für Gliompatienten darstellt und Patienten durchschnittlich 10 Jahre ab der Diagnose überleben [64, 66, 68].

Die Methylierung der Cytosine der CpG Inseln ist ein epigenetischer Mechanismus zur Regulation der Genexpression [69]. Einige Gliome weisen eine erhöhte Methylierung der CpG Inseln auf. So wurde zum Beispiel der prognostische Marker O<sup>6</sup>-Methylguanin-DNA-

Methyltransferase (MGMT) identifiziert. MGMT ist ein Hauptbestandteil des DNA Reparaturmechanismus und zählt zu den Tumorsuppressoren. MGMT konvertiert O<sup>6</sup>-Methylguanin zurück in Guanin und verhindert so Fehler bei der DNA Replikation und Transkription [70, 71]. In Gliomen sind häufig die CpG Inseln der Promotorregion des *MGMT* Gens methyliert, was zu einer Verminderung der Expression führt [72, 73]. Der Verlust der *MGMT* Expression führt zu einer erhöhten Sensitivität gegenüber Chemotherapeutika wie TMZ [74, 75] und einer verlängerten Überlebensdauer der Patienten um etwa 24 Monate [74, 76]. Die Betrachtung des Methylierungsstatus wurde mittlerweile erweitert und als CIMP Phänotyp definiert, der im Hinblick auf die Prognose von Gliompatienten untersucht wurde. Patienten mit einem erhöhten Methylierungsstatus (CIMP<sup>Pos</sup>) tragen auch zusätzlich die IDH1 Mutation und haben eine bessere Prognose als die CIMP<sup>Neg</sup> Patienten [68]. An Hand des CIMP Status in Kombination mit den anderen prognostischen Marker konnten die niedergradigen Gliome weiter unterteilt werden [68, 77]. Die beste Prognose haben Patienten mit einer IDH1 Mutation, dem CIMP<sup>Pos</sup> Phänotyp und einem LOH 1p/19q, dies schließt hauptsächlich Oligodendrogliome ein. Eine moderate Prognose wird den Patienten zu geschrieben bei denen ebenfalls eine IDH1 Mutation und ein CIMP<sup>Pos</sup> Phänotyp vorliegt, aber kein LOH 1p/19q besteht. Diese Gruppe entspricht den Astrozytompatienten. Astrozytome bei denen keine IDH1 Mutation und ein CIMP<sup>Neg</sup> Phänotyp vorliegt, führen zu einer schlechten Prognose und werden als Glioblastom ähnlich beschrieben. Der CIMP<sup>Pos</sup> Phänotyp korreliert mit der Mutation von IDH1 in niedergradigen Gliomen [68].

- **Neurale Gliome**  
Die neurale Untergruppe wird hauptsächlich von der Genexpression von F-Box Protein 3 (*FBXO3*), *Gamma-Aminobutyric Acid A Receptor Beta 2* (*GABRB2*), *Synuclein Gamma* (*SNCG*) und Basisches Myelinprotein (*MBP*) beschrieben und beinhaltet Gliome, deren Expressionsprofil sich unwesentlich von dem Profil des gesunden Gehirngewebes unterscheidet.
- **Klassische Gliome**  
Klassische Gliome exprimieren Gene wie zum Beispiel Fibroblastenwachstumsfaktorrezeptor 3 (*FGFR3*), *Platelet-Derived Growth Factor A* (*PDGFA*), *EGFR* und *V-Akt Murine Thymoma Viral Oncogene*



*Homolog 2 (AKT2)*. EGFR ist in diesen Gliomen häufig mutiert oder überexprimiert. Eine konstitutiv aktive Form ist die EGFR Variante III (EGFRvIII). Die erhöhte Aktivität von EGFR führt zu der gesteigerten Proliferation der Zellen [78, 79]. Die Expression von EGFRvIII im Vergleich zu der Expression des normalen EGFR führt in Patienten zu einer um etwa 4 Jahre geringeren Lebenserwartung [80, 81]. Weitere prognostische Marker, die in klassischen Gliomen auftreten, sind die Amplifikation von Chromosom 7, der Verlust von Chromosom 10 und die Deletion des *Ink4a/ARF* Locus, so wie die Mutation von Tumorprotein 53 (*TP53*). Die Mutation von *TP53* tritt häufig in Astrozytomen auf. *TP53* wird zu den Tumorsuppressorgen gezählt, da es eine essentielle Rolle bei der Aufrechterhaltung der Stabilität des Genoms trägt und Mutationen verhindert. Punktmutationen von *TP53* führen zu dem Verlust der Funktion von dessen Protein p53 [82, 83]. Dies führt dazu, dass sich die betroffenen Zellen trotz Schäden in der DNA unkontrolliert teilen und zusätzlich vom aeroben Stoffwechsel zu anaerober Glykolyse übergehen können [84]. Die Mutationen des *TP53* Gens führt zu einer negativen Prognose für die betroffenen Patienten [64, 85]. Patienten bei denen *TP53* nicht mutiert ist, überleben durchschnittlich 20 Monate länger als Patienten mit einer mutierten Form des *TP53* Gens [86]. Gliome dieser Untergruppe zählen hauptsächlich zu den hochgradigen Glioblastomen und die Prognose ist entsprechend der exprimierten Marker eher schlecht.

- Mesenchymale Gliome

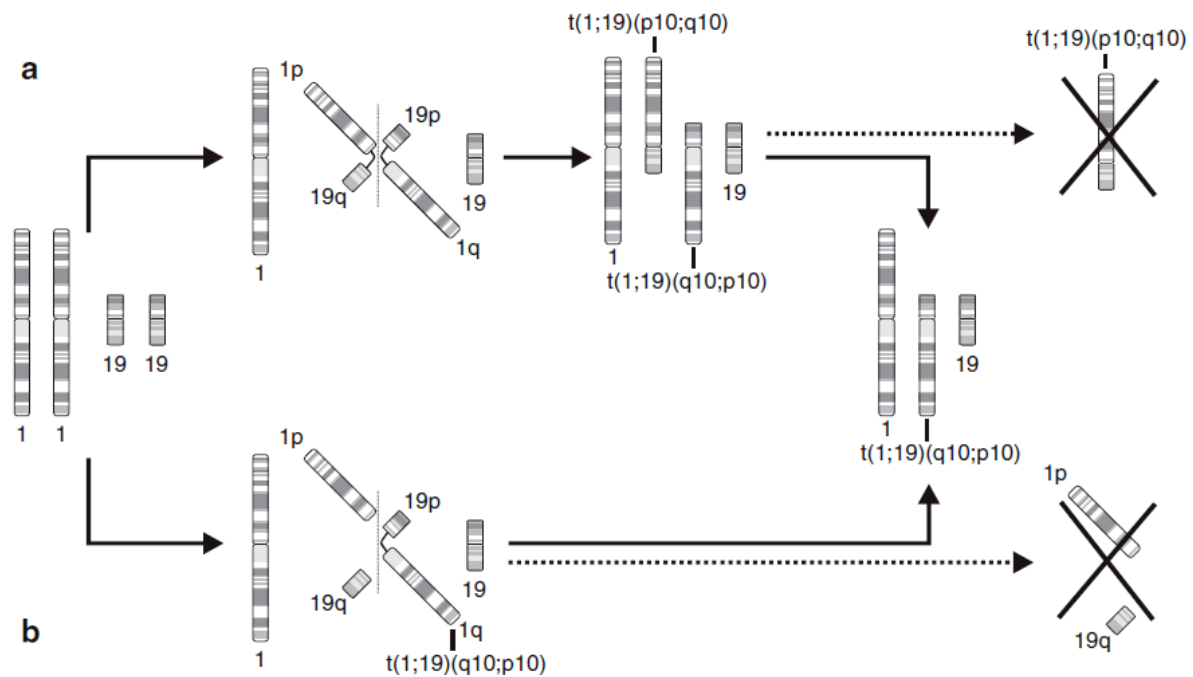
Die mesenchymale Untergruppe wird durch die Expression von Caspasen, Interleukin 4 Rezeptor (*ILR4*), *Chitinase 3-like Protein (CHI3L)*, *Tumor Necrosis Factor Receptor Type 1-associated DEATH domain Protein (TRADD)*, Toll-like-Rezeptor 2 (*TLR2*), Toll-like-Rezeptor 4 (*TLR4*) und V-Rel Avian Reticuloendotheliosis Viral Oncogene Homolog B (*RELB*) definiert. Die hohe Expression von *CHI3L* aber auch von c-Met sind prognostische Marker für diese Untergruppe [59]. Des Weiteren wurde der Verlust von Neurofibromin 1 (NF1) und die protumorigene Regulation des Immunsystems als charakteristische Merkmale der mesenchymalen Untergruppe beschrieben [87, 88].

Die Komplexität, die durch die Expressionsanalysen entsteht, wurde in eine mögliche hierarchische Einteilung der Gliome postuliert. Die Einteilung nach der *International*

*Society of Neuropathology* basiert auf einem Stufenmodell, bei dem als erste Grundlage die histologische Klassifizierung verwendet wird. Anschließend wird das Stufenmodell auf denen von der WHO 2007 definierten Grade und den molekularen Markern eingeteilt. Dementsprechend würde es zu einer Unterkategorisierung der einzelnen Gliomarten kommen, wie zum Beispiel die Einteilung in Astrozytome mit IDH1 Mutation und ohne IDH1 Mutation, die entsprechend der Marker deutliche Unterschiede in der durchschnittlichen Überlebenszeit haben. [89] Auf Grund der neuen Erkenntnisse wird 2016 eine neue WHO Klassifizierung der Gliome definiert, die auf der oben beschriebenen Einteilung basieren wird [90]. Zusätzlich wurde durch weitere Studien postuliert, dass nach der Identifikation von molekularen Markern, die Oligoastrozytome entweder zu den Astrozytomen oder den Oligodendrogliomen gezählt werden sollten [67]. Weitere Betrachtungen der niedergradigen Gliome ergaben die Hypothese, dass die Oligodendrogliome zu den Astrozytomen mit proneuralem Hintergrund gezählt werden sollten [61, 91].

### 1.4 LOH 1p/19q

Der LOH 1p/19q nimmt durch die Lokalisation des *PRDX1* Gens auf 1p34.1 einen besonderen Stellenwert für diese Arbeit ein, sodass dieser im folgenden Kapitel genauer beschrieben wird. Der LOH 1p/19q wurde als positiver prognostischer Marker identifiziert. Im Vergleich überleben Patienten deren Tumore einen LOH 1p/19q aufweisen deutlich länger als Patienten ohne LOH 1p/19q [9, 92, 93]. Die Translokation der Chromosomenarme 1p und 19q, die der Entstehung eines LOH 1p/19q zu Grunde liegt, wird durch die Anordnung der Chromosomen während der Teilung der Vorläuferzellen von Oligodendrogliomen gefördert [94, 95]. Die Zentromerregionen der beiden Chromosomen weisen eine hohe Homologie auf. Dies führt dazu, dass diese sich während der Mitose aneinander lagern und instabil werden, sodass eine Translokation der Chromosomenarme ermöglicht wird [95]. Bei der Translokation fusioniert je ein Chromosom 1 und ein Chromosom 19 zu den fusionierten Chromosomen t(1;19)(p10;q10) und t(1;19)(q10;p10) (Abb. 2 a). Das fusionierte Chromosom t(1;19)(p10;q10) geht anschließend verloren. Eine geringfügige Abweichung zu diesem Mechanismus kann entstehen, wenn die Chromosomenarme 1p und 19q nicht fusionieren sondern direkt abgebaut werden (Abb. 2 b). Als Produkt dieser Translokation verbleiben letztendlich je ein intaktes Chromosom 1 und ein Chromosom 19 sowie das fusionierte Chromosom t(1;19)(q10;p10), welches aus dem kurzen Arm von Chromosom 19 (19p) und dem langen Arm von Chromosom 1 (1q) besteht.



**Abb. 2: Übersicht über die Entstehungsmechanismen des LOH 1p/19q.** (A) Nach der Translokation an den Zentromerregionen der Chromosomen 1 und 19 entstehen zwei derivate Chromosomen t(1;19)(p10;q10) und t(1;19)(q10;p10), von denen das t(1;19)(p10;q10) verloren geht. (B) Alternativ wird nur das derivative Chromosom t(1;19)(q10;p10) gebildet und die einzelnen Chromosomenarme 1p und 19q abgebaut. Abbildung entnommen aus Hartmann und von Deimling, 2009 [60]

Die deletierten Chromosomenbereiche wurden in einigen Studien auf Genom- und Transkriptelevel charakterisiert. Hierbei wurden einige Kandidatengene identifiziert, darunter *TP73* (Chr. 1p36.3) [96], *CITED4* (Chr. 1p34.2) [97] und *CDKN2C* (Chr. 1p32) [98] auf Chromosom 1p und *p190RhoGAP* (Chr. 19q13.3) [99] und *EMP3* (Chr. 19q13.3) [100] auf Chromosom 19q. Der Verlust der Genexpression geht häufig mit der Methylierung der CpG Inseln auf dem verbleibenden Chromosomenarm einher, dies konnte zum Beispiel für *TP73*, *CDKN2C* und *EMP3* gezeigt werden. Ein weiteres Kandidatengen auf Chromosom 1p ist *PRDX1* (Chr. 1p34.1), welches als prognostischer aber auch funktioneller Marker beschrieben wurde [97, 101]. Die Reduktion der Genexpression wurde neben dem Verlust des Chromosomenarm 1p sowie durch die Methylierung der Cytosine innerhalb der CpG Inseln erzeugt.

### 1.5 Peroxiredoxine (PRDX)

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass der in mehreren Subtypen der Gliome vorkommende Verlust des Chromosomenarm 1p ebenfalls einen positiven Effekt auf die Prognose der Patienten hat [92, 102].

Peroxiredoxine gehören zu einer Familie von ubiquitär vorkommenden Enzymen, die an dem Abbau von reaktiven Sauerstoffverbindungen (ROS) beteiligt sind [103, 104]. Dabei spielt die

Qualität der ROS eine untergeordnete Rolle, als Substrate können sowohl Wasserstoffperoxid ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) [105], Peroxinitrite und organische ROS haltige Verbindungen ( $\text{R-OOH}$ ) dienen [106-110]. In Säugetieren wurden sechs PRDX Proteine identifiziert, die an der Metabolisierung von ROS beteiligt sind. Des Weiteren sind sie durch ihren Einfluss auf ROS an der Regulation von Signalkaskaden beteiligt und beeinflussen so die Proliferation, Differenzierung und Apoptose von Zellen [106, 111]. Die Redoxaktivität der PRDX Proteine wird über Cysteine ermöglicht. Anhand der an der Redoxreaktion beteiligten Cysteine wurde die PRDX Familie unterteilt: 1-Cystein (1-Cys) PRDX und 2-Cystein (2-Cys) PRDX [103].

Die Peroxidasereaktion besteht aus zwei Schritten am peroxidativen Cystein ( $\text{Cys-S}_\text{P}\text{H}$ ), von denen der Erste für alle PRDX Proteine gleich ist. Hierbei reduziert das peroxidative Cystein unter der Bildung von Sulfensäuren am Cystein ( $\text{Cys-S}_\text{P}\text{OH}$ ) die ROS [112-114] (Abb. 3). Die Wiederherstellung des peroxidativen Cysteins ist für die PRDX Varianten unterschiedlich:

### 1.5.1 Typische 2-Cys PRDX Enzyme

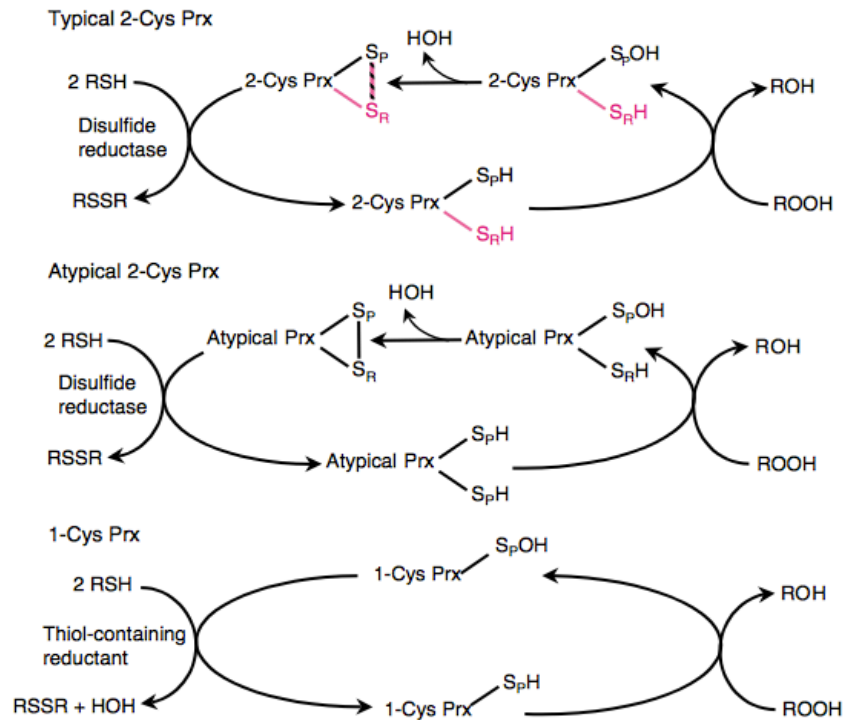
Zu den typischen 2-Cys PRDX Enzymen gehören die PRDX Varianten PRDX1, PRDX2, PRDX3 und PRDX4. Diese haben zwei Cysteine, die an der Redoxreaktion beteiligt sind – das peroxidative Cystein und das reduzierende Cystein ( $\text{Cys-S}_\text{R}\text{H}$ ) [106]. Das peroxidative Cystein befindet sich zumeist um die Position 50 der Aminosäuresequenz von PRDX, während das reduzierende Cystein in der Nähe der Position 170 lokalisiert ist. Die typischen 2-Cys PRDX Proteine bilden Homodimere und formen so zwei identische aktive Zentren, bestehend aus je einem peroxidativen und einem reduzierenden Cystein [115-118]. Das reduzierende Cystein des einen PRDX Moleküls bildet eine Disulfidbrücke mit dem oxidierten peroxidativen Cystein des anderen Moleküls aus. Diese Disulfidbrücken werden über Disulfid-Oxidoreduktasen wie zum Beispiel Thioredoxin (Trx) abgebaut, um sowohl das peroxidative Cystein und das reduzierende Cysteine wiederherzustellen (Abb. 3) [119-121].

### 1.5.2 Atypische 2-Cys PRDX Enzyme

Das bisher einzige bekannte atypische 2-Cys PRDX Protein in Säugetieren ist PRDX5. Der Abbau von ROS durch atypische 2-Cys PRDX Enzyme unterliegt dem selben Mechanismus wie der Abbau durch die typischen 2-Cys PRDX Enzyme. Jedoch funktionieren atypische 2-Cys PRDX Enzyme durch die Ausbildung intramolekularer Disulfidbrücken als Monomere (Abb. 3) [122, 123].

### 1.5.3 1-Cys PRDX Enzyme

PRDX6 ist das bisher einzige bekannte 1-Cys PRDX Enzym in Säugetieren. Die Besonderheit von 1-Cys PRDX Enzymen ist, dass sie nur das peroxidative Cystein aufweisen und kein reduzierendes Cystein besitzen [113]. Hierbei wird das oxidierte peroxidative Cystein durch Thiol enthaltende Elektronendonatoren reduziert (Abb. 3). Diese Elektronendonatoren sind weitestgehend unbekannt, es wurden bisher jedoch Glutathion, Liponsäure und Cyclophilin diskutiert [106, 110, 124, 125].



**Abb. 3: Redoxreaktion der unterschiedlichen PRDX Enzyme.** Oben wird der Mechanismus für typische 2-Cys PRDX Proteine aufgezeigt. In Pink ist das reduzierende Cysteine des anderen PRDX Moleküls des Dimers gezeichnet. In der Mitte ist das atypische PRDX Proteine zusehen und unten das 1-Cys PRDX Proteine. Abkürzungen: R – Rest; Prx – PRDX; Cys-S<sub>P</sub>H – peroxidatives Cystein; Cys-S<sub>R</sub>H – reduzierendes Cystein; Cys-S<sub>P</sub>OH – Cystein mit Sulfensäure; HOH – H<sub>2</sub>O. Abbildung entnommen aus Z.A. Wood et al., 2003 [126]

Die 2-Cys PRDX Proteine bilden je nach Redoxstatus nicht nur Dimere sondern auch Decamere aus [127]. Dementsprechend konnten einige Studien zeigen, dass die Regulation des Redoxstatus die Oligomerisierung beeinflusst wie zum Beispiel die Reduktion der an der Redoxreaktion beteiligten Disulfidzentren [116, 118, 128] und die Überoxidation der peroxidativen Cysteine zu Sulfinsäurederivaten (Cys-SO<sub>2</sub>H oder Cys-SO<sub>3</sub>H) [116]. Die Bedeutung des Redoxstatus wurde für das PRDX Homolog der Bakterien [118, 129] sowie für PRDX2 [116] bestätigt.

Die Bildung der Decamerstruktur ist für die Funktion der PRDX Enzyme wichtig, da diese eine höhere Aktivität aufweist als die dimere Form [119, 130, 131]. Durch die Veränderung der Cysteingruppen des PRDX während des Abbaus von ROS werden Redox abhängige

Signalwege durch zum Beispiel die Erhöhung von Enzymen oder Transkriptionsregulatoren moduliert [132]. Die Induktion der Apoptose ist ein Beispiel für die Regulation von Signalkaskaden. Hierbei spielt das Verhältnis zwischen aktivem und inaktivem PRDX eine ausschlaggebende Rolle und reguliert so die durch Cytokine induzierte Apoptose [133].

### 1.6 PRDX1

Das 2-Cys PRDX Protein PRDX1 ist auf 1p34.1 codiert und von dem LOH 1p/19q betroffen [97, 101]. Zusätzlich konnte bereits gezeigt werden, dass der einzelne Verlust des Chromosomenarm 1p die Prognose der Patienten mit Gliomen auch Therapie unabhängig positiv beeinflusst [9, 92, 134]. L. Dittmann und Kollegen konnte bereits zeigen, dass der Verlust von PRDX1 *in vitro* die Sensitivität der Gliomzellen gegenüber TMZ steigert [101]. Dies legt die Hypothese nahe, dass PRDX1 eine wichtige Rolle für die Prognose der Gliompatienten spielen könnte. Welchen Einfluss PRDX1 dabei auf die Migrationsfähigkeit der Gliomzellen hat, ist bisher noch nicht untersucht.

PRDX1 gehört zu den typischen 2-Cys PRDX Proteinen, sodass der oben beschriebene Mechanismus zur Detoxifizierung von ROS greift. ROS entstehen zum Beispiel während des normalen intrazellulären Stoffwechsels [135], durch Medikamente und ähnlichen Substanzen [136] oder durch die Regulation von Onkoproteinen wie die Überexpression von c-myc [137-139]. Der Verlust von PRDX1 führt zu einer Erhöhung der intrazellulären ROS, sodass eine erhöhte Oxidation von Lipiden, Proteinen und Nukleinsäuren auftritt [140-142]. Die Oxidation der DNA führt häufig zu Einzel- oder Doppelstrangbrüche der DNA [140, 143]. Die antioxidative Wirkung von PRDX1 reguliert einige Signalwege über die Eliminierung des sekundären Botenstoffs  $H_2O_2$ , welche zum Beispiel an der Proliferation und Differenzierung beteiligt sind [144]. Dieses Regulationssystem der Signaltransduktion wird durch die Modulation der Peroxidaseaktivität von PRDX1 vollendet. Dies erfolgt auf Proteinebene durch die Phosphorylierung des Tyrosins an Position 194, was zu der Inaktivierung der Peroxidaseaktivität führt [145]. Die Inaktivierung durch Phosphorylierung ist ein lokales Ereignis und führt so zu der Entstehung eines ROS Gradienten, welcher essentiell für die Regulation der Signalwege ist [146]. Im Gegensatz dazu kann PRDX1 durch eine gesteigerte Transkription ebenso positiv reguliert werden. Die Promotorregion von *PRDX1* enthält ein Bindungselement für *Nuclear Factor (Erythroid-Derived 2)-Related Factor 2* (Nrf2), das sogenannte *antioxidant response element*, wodurch die Transkription gesteigert wird [147-149]. Auslösende Faktoren hierfür sind zum Beispiel proliferative Stimuli [150], Stickstoffmonoxid [151] und oxidativer Stress [152].

Im Vergleich von PRDX1 und des fast homologen PRDX2 zeigte sich, dass PRDX1 wesentlich schneller zu einer Überoxidation des peroxidativen Cysteins neigt [153]. Die Überoxidation von PRDX1 führt dazu, dass die ausgebildete Decamerstruktur, die der

Chaperonaktivität zugrunde liegt [154-157], stabiler ist [116, 126, 158]. Nach der Überoxidation zu Sulfinsäure wird nicht nur die Peroxidaseaktivität inaktiviert [159] sondern auch die Interaktion mit anderen Proteinen wie zum Beispiel *Phosphatase and Tensin Homolog* (PTEN) beeinflusst [160]. Die Interaktionen mit anderen Proteinen kann durch die Decamerformation entweder verringert werden wie bei PTEN [160] oder sogar verstärkt bzw. überhaupt ermöglicht werden [161, 162]. Als weitere Interaktionspartner wurden bisher c-myc [163], DNA und RNA Moleküle [164], sowie Apoptosesignalregulierende Kinase 1 (ASK1) [165, 166], Mitogenaktivierte Proteinkinase Phosphatase 5 (MKP-5) [167] und p38 MAPK [168] identifiziert. Als Regulation der Chaperonfunktion wurde die Modulation der Decamere in Betracht gezogen. Erste Studien zeigten, dass die Bildung der Decamere reversibel ist [169]. In Hefe konnte gezeigt werden, dass Sulfiredoxin (Srx) die Sulfinsäure des Cysteins unter der Verwendung von ATP und Thiol als Elektronendonator zu Sulfinphosphorylester reduziert, welches anschließend von Trx analog zu dem in Abbildung 3 gezeigten Ablauf weiter reduziert werden kann [170]. Der Vergleich von PRDX1 und dem nahezu homologen PRDX2 zeigt, dass PRDX1 ein zusätzliches Cystein an Position 83 besitzt, welches in der Decamerstruktur zwischen den Dimeren positioniert ist. Der Austausch dieses Cysteins an Position 83 mit Serin reduziert die Chaperonaktivität während die Peroxidaseaktivität zu nimmt [153]. Dies legt die Hypothese nahe, dass in PRDX1 die Cysteine an Position 52 und 173 die Peroxidasefunktion aufrecht erhalten und das zusätzliche Cystein an Position 83 für die Chaperonfunktion essentiell ist. In den letzten Jahren wurde der Chaperonfunktion von PRDX1 zunehmende Aufmerksamkeit geschenkt und immer mehr Zielproteine identifiziert. Welche Funktion von PRDX1 dem Einfluss auf die Gliomzellen jedoch zu Grunde liegt, ist noch weitestgehend ungeklärt und bedarf noch weiterer Forschung.

### 1.7 Therapie von Gliomen

Die aktuelle Therapie von Gliomen beinhaltet neben der chirurgischen Resektion eine gezielte Bestrahlung und die Behandlung mit dem Chemoterapeutikum TMZ [5, 6]. Es entwickeln sich jedoch häufig rezidivierende Tumore [7]. In den folgenden Abschnitten werden die Chemotherapie mit TMZ und neue Therapieansätze beschrieben:

#### 1.7.1 Chemotherapie mit TMZ

TMZ ist ein Imidazotetrazinderivat, das durch die Methylierung der DNA -vor allem an Guanin (O<sup>6</sup>-Methylguanin)- zytotoxisch auf proliferierende Zellen wirkt [171]. Die Methylierung der in der DNA enthaltenen Basen führt zu falschen Basenpaarungen und DNA-Quervernetzungen, sodass die Mitose nicht mehr regelgerecht ablaufen kann und die Apoptose eingeleitet wird. Die Behandlung mit Bestrahlung und TMZ

erhöht das durchschnittliche Überleben von Glioblastompatienten von 12.1 Monaten für die Behandlung mit Bestrahlung alleine auf 14.6 Monate [172]. Das Langzeitüberleben zeigte ebenfalls einen positiven Effekt von TMZ auf das durchschnittliche Überleben [173]:

<u>Jahre nach Diagnose</u>	<u>Bestrahlung</u>	<u>Bestrahlung + TMZ</u>
2 Jahre	10.9%	27.2%
3 Jahre	4.4%	16%
4 Jahre	3%	12.1%
> 5 Jahre	1.9%	9.8%

Einige der oben beschriebenen molekularen Marker wirken sich auf die Sensitivität gegenüber TMZ aus. MGMT konvertiert O6-Methylguanin zurück zu Guanin, sodass der Einfluss des MGMT Verlusts auf die Sensitivität gegenüber TMZ nahe liegt. Studien zeigten, dass 46% der mit Bestrahlung und TMZ behandelten Patienten ohne MGMT Expression 2 Jahre überlebten, während nur 14% der Patienten mit MGMT Expression 2 Jahre erreichten [74, 174]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Mutation von IDH1 die Sensitivität gegenüber TMZ erhöht [175], während die Expression von EGFRvIII eine Resistenz gegenüber TMZ aufbaut [176].

### 1.7.2 Neue Therapieansätze

In vielen Gliomen konnte eine Überexpression oder Mutation von Transmembranrezeptoren wie EGFR und VEGFR beobachtet und mit der unkontrollierten Zellteilung und der Angiogenese korreliert werden [177, 178].

- EGFR Inhibitoren

Der EGFR Inhibitor Cetuximab induziert Apoptose und die Expression von VEGF in Gliomzellen *in vitro* [179]. Jedoch zeigte die bisher durchgeführte klinische Studie, in der die Behandlung mit Bestrahlung und TMZ durch Cetuximab erweitert wurde, keine wesentliche Erhöhung des durchschnittlichen Überlebens [180].

- VEGFR Inhibitoren

VEGFR Inhibitoren wie Bevacizumab erzielten bereits bei Dickdarmkrebs und bei nicht-kleinzelligem Lungenkrebs in Kombination mit den angewendeten Chemotherapien erste Erfolge [181, 182]. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper der VEGF bindet, sodass VEGFR nicht mehr gebunden und



aktiviert werden kann [183]. Die erweiterte Behandlung von Gliomen mit Bestrahlung, TMZ und Bevacizumab befindet sich bereits in der klinischen Studie [184], ebenso wie weitere Inhibitoren von VEGFR wie Cediranib, Sorafenib und Sunitinib [185-187]. Jedoch war bisher keine Veränderung des durchschnittlichen Überlebens zu beobachten.

- Tyrosin Kinase Inhibitoren

Tyrosin Kinase Inhibitoren umfassen ein größeres Inhibitionsspektrum als die Inhibitoren von EGFR und VEGF/VEGFR. Tyrosin Kinase Inhibitoren wie zum Beispiel Gefitinib und Erlotinib befinden sich bereits in klinischen Studien zur Anwendung in Kombination mit Bestrahlung und der Behandlung mit TMZ bei Gliomen [188]. Jedoch konnten dabei nur moderate Erfolge erzielt werden, Gefitinib erhöhte das progressionsfreie Überleben von 8.1 Wochen auf 39.4 Wochen [189] und Erlotinib konnte das progressionsfreie Leben um 2-3 Monate verlängern [190]. Kombinierte man diese Inhibitoren jedoch nicht mit Bestrahlung und TMZ so konnte kein Effekt auf das Überleben beobachtet werden [191].

Zusammengenommen zeigen die bisher verfolgten Therapieansätze mit einer Steigerung des durchschnittlichen Überlebens von etwa 3 Monaten nur geringe Erfolge. Dies verdeutlicht die Dringlichkeit und den Bedarf an Ansatzpunkten für neue Therapien und Therapiekombinationen.

### 1.8 Molekulare Grundlagen der Zellbewegung

Als Migration bezeichnet man die aktive Fortbewegung von Zellen. Dies bezieht die ungerichtete Migration aber auch die chemotaktisch gesteuerte Bewegung ein. Adhärenz Zelllinien bedienen sich *in vitro* dabei zu meist einer auf der Ausbildung und Adhäsion von Zellfortsätzen beruhenden Bewegung. Die Migration von Zellen ist ein mehrstufiger Prozess, der mit der Ausbildung von Zellfortsätzen und der Bildung neuer Fokaladhäsionen beginnt. Dies wird gefolgt von dem Rückziehen des Zellkörpers und dem Auflösen der Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle. [192] Dementsprechend sind die essentiellen Schritte die dynamische Regulation des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen. In den folgenden Abschnitten werden diese Regulationsmechanismen und ihr Einfluss auf die Migration der Zellen genauer beschrieben:

### 1.8.1 Umbau des Actin Zytoskeletts

Actin kann entweder als Monomer (G-Actin) oder als Filament vorliegen. Actin Filamente bestehen aus zwei Actinsträngen, die ein helixförmiges Polymer formen und eine Polarität aufweisen. Dementsprechend werden die Enden als Plus- und Minusende bezeichnet [193]. Um diese Konformation des Actins aufrecht zu erhalten wird aus der Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP) direkt am Actinfilament Energie gewonnen. Hierzu wird während der Polymerisation von Actin am Plusende des Filaments ATP gebundenes G-Actin eingebaut. Das ATP wird im Filament zu Adenosindiphosphat (ADP) und einem Phosphatrest (P) unter der Gewinnung von Energie abgebaut. Das ADP gebundene G-Actin wird dann am Minusende wieder aus dem Filament entfernt [194]. Dieser Vorgang des dynamischen An- und Abbau von Actinmonomeren an den Filamenten nennt man Laufbandeffekt (*treadmilling effect*) [195]. Neben der beschriebenen Aufrechterhaltung der Filamentkonformation ist die Bindung zu ATP oder ADP wichtig für die Interaktion mit verschiedenen weiteren Proteinen die den Umbau der Actinfilamente beeinflussen. Das Actin Zytoskelett ist essentiell für viele Prozesse innerhalb der Zelle wie dem intrazellulären Transport, Zellteilung und Zellbewegung [196]. In dieser Arbeit liegt der Fokus jedoch auf dem Einfluss auf die Zellbewegung, die maßgeblich durch die dynamische Regulation der Actinfilamente und der Bildung von Zellfortsätzen bestimmt wird. Hierfür werden drei Actin enthaltende Strukturen beschrieben – Lamellipodien, Filopodien und kontraktile Stressfasern. Lamellipodien entstehen durch die Vernetzungen von Actinfilamenten, die hauptsächlich durch den Arp2/3 Komplex initiiert werden [197-199]. Filopodien oder Mikroausstülpungen (*Microspikes*) der Lamellipodien werden durch parallel angeordnete Actinfilamente gebildet und sind lange filigrane Zellfortsätze [200, 201]. Stressfasern entstehen durch die anti-parallele Anordnung der Actinfilamente und der Assoziation mit Myosin-Mikrotubuli, um die Kontraktilität zu ermöglichen [202, 203]. Während der Zellmigration sind alle drei Filamentarten und deren dynamischer Umbau nötig, um die Kraft den Zellkörper vorwärts zu bewegen aufzubauen [204].

### 1.8.2 Actin Polymerisation

Wie bereits beschrieben ist die Polymerisation von Actinfilamenten anhängig von der Bindung zu ATP bzw. ADP. Die unterschiedliche Verteilung von ATP und ADP führt dazu, dass die Actinfilamente schneller an den Minusenden als an den Plusenden depolymerisieren. Zusätzlich wird die Polymerisation bzw. Depolymerisation durch verschiedene Proteine reguliert. Diese werden im Folgenden erklärt:

- $\beta$ -Thymosin

$\beta$ -Thymosin ist ein cytosolisches Protein, das monomeres Actin in einen Komplex bindet und dadurch Polymerisation von Actinfilamenten verhindert [205, 206].

- Profilin

Profilin ist ein Actinmonomer bindendes Protein, das zusätzlich das gebundene ADP gegen ATP austauscht [207]. Die Bindung von G-Actin an Profilin ist abhängig von Gesamtkonzentration von G-Actin in der Zelle. Der gebildete Komplex aus Profilin und G-Actin dient als Substrat für die weitere Proteine wie Formin oder WASP und fördert so die Polymerisation von Actinfilamenten [208].

- Arp2/3 Komplex

Der Arp2/3 Komplex besteht aus sieben Untereinheiten und spielt eine wichtige Rolle bei der Polymerisation und Vernetzung des Actin Zytoskeletts [209]. Der Arp2/3 Komplex fördert die Polymerisation von Actinfilamenten, indem es neue Ansatzpunkte für Actinfilamente einführt, dies ist zum Beispiel nötig für die Ausbildung von Lamellipodien [197, 199]. Der Arp2/3 Komplex kann entweder über *Cell division control protein 42 homolog* (Cdc42) und Wiskott-Aldrich Syndromprotein (WASP) aktiviert werden [210, 211] oder über *Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1* (Rac1) und *WASP-family verprolin-homologouse protein* (WAVE) [192, 211, 212].

- Formin

Formin fördern die Polymerisation von Actin Filamenten durch die konservierten FH1-Domänen und FH2-Domänen [213] Dabei bindet die FH2-Domäne zwei in Filamenten gebundene Actinstränge, um diese so zu stabilisieren. Die FH1-Domäne hingegen bindet den Komplex aus G-Actin und Profilin und kann das ATP gebundene G-Actin daraus rekrutieren um es an die bestehende Actinfilamente zu binden [208, 214, 215]. Des Weiteren entfernt Formin sogenannte *capping*-Proteine wie zum Beispiel Gelsolin, welche die Plusenden des Actinfilaments blockieren [216].

- Cofilin

Ein weiterer Mechanismus die Polymerisation der Actinfilamente positiv zu beeinflussen ist das Schneiden von bestehenden Actinfilamenten. Dies

ermöglicht die Bildung neuer Actinmonomere und erhöht die Anzahl der Plusenden zur Elongation [217]. Die Zunahme von G-Actin erhöht die Polymerisationsrate an den Plusenden [218]. Jedoch zeigen mehrere Studien, dass der Prozess einem Gleichgewicht unterliegt. So steigert eine moderate Überexpression von Cofilin in Gliomzellen die Migration [219, 220], während eine enorme Überexpression (15-fach) genauso wie der Verlust von Cofilin zu einer reduzierten Migration führt [221, 222]. Cofilin wird durch die LIM Kinase (LIMK) negativ reguliert. Diese Regulation unterliegt der Aktivierung von *Ras homolog gene family, member A* (RhoA) [223].

### 1.8.3 Formation von Fokaladhäsionen

Neben der Regulation der Dynamik des Actin Zytoskeletts ist die Modulation der Zelladhäsion wichtig für die Motilität der Zellen. Zellen adhären mittels Fokaladhäsionen an ihrer Umgebung und stabilisieren so zum Beispiel neugebildete Zellfortsätze, um die Kraft aufzubauen den Zellkörper vorwärts zu ziehen [224]. Am hinteren Ende der Zelle müssen die Fokaladhäsionen abgebaut werden, sodass die Zellen sich fortbewegen können. Während der dynamischen Regulation der Fokaladhäsionen werden die Kontakte als entweder fokale Komplexe und Fokaladhäsionen bezeichnet. Die fokalen Komplexe bilden in den neu ausgebildeten Zellfortsätzen den ersten Kontakt zu der Oberfläche aus. Die Ausbildung der fokalen Komplexe wird durch Rac1 und Cdc42 gesteuert, während der Entwicklung zu Fokaladhäsionen wird die Regulation von RhoA übernommen [225-228]. Fokaladhäsionen dienen als Verbindung der Stressfasern des Actin Zytoskeletts mit der Umgebung in der sich die Zellen befinden. Fokaladhäsionen bestehen aus mehreren interagierenden Proteinen, die sich in einer festgelegten Reihenfolge zusammenfügen. Im folgenden Abschnitt werden die wichtigsten Interaktionspartner der Fokaladhäsionen erklärt:

- FAK und *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase* (Src)

An der Regulation von Fokaladhäsionen sind maßgeblich zwei Kinasen beteiligt – FAK und Src. Die Aktivität dieser Kinasen hat einen positiven Effekt auf die Dynamik der Fokaladhäsionen und somit auf die Migration der Zellen. So führt der Verlust von FAK zum Beispiel zu einer verringerten Bildung von Zellfortsätzen [229] und einem fast vollständigen Verlust der Migration von Fibroblasten [230].

Nach der Bindung von FAK an Liganden wie zum Beispiel Integrine aktiviert sich FAK selbst durch die Autophosphorylierung des Tyrosins an Position 397

(Y397) [231]. Dies führt zu der Rekrutierung von weiteren Proteinen wie Src, p130Cas und Paxillin [232, 233]. Die andere wichtige Kinase ist Src, die durch die Bindung an FAK pY397 aktiviert wird. Aktiviertes Src wiederum phosphoryliert weitere Bestandteile der Fokaladhäsionen wie zum Beispiel p130Cas und Paxillin, aber auch weitere Tyrosine von FAK [234, 235]. Die weitere Phosphorylierung von FAK an Y576 und Y577 führt zu einer gesteigerten Aktivität [236], während die Phosphorylierungen an Y861 und Y925 notwendig sind um FAK mit Ras Proteinen zu verbinden oder um den MAPK Signalweg zu aktivieren [237-239]. Jedoch kann die Phosphorylierung von FAK durch Src auch zum Ausschluss von FAK aus der Fokaladhäsion führen [240]. Dies steht im Gegensatz zu Studien die zeigten konnten, dass phosphoryliertes FAK die Bildung von Fokaladhäsionen erhöht [241]. Dies impliziert, dass die Rolle von FAK in der dynamischen Umwandlung von Fokaladhäsionen abhängig von dem Phosphorylierungsstatus von FAK ist. So führt die Phosphorylierung an Y397 zu einer erhöhten Bildung von Fokaladhäsionen, während die Phosphorylierung von Y925 zu deren Abbau führt [240, 242].

- Protein Tyrosinphosphatase mit PEST Motiv (PTP-PEST)

Neben der Phosphorylierung ist die Dephosphorylierung wichtig um den dynamischen Umsatz von Fokaladhäsionen zu gewährleisten. Eine der wichtigsten Phosphatasen ist PTP-PEST. Studien an PTP-PEST zeigten, dass für die Zellmigration ein Gleichgewicht zwischen Phosphorylierung und Dephosphorylierung der Fokaladhäsionsproteine benötigt wird. So inhibiert sowohl die Überexpression als auch der Verlust von PTP-PEST die Zellmigration [243, 244].

- Paxillin

Paxillin ist ein Gerüstprotein, das an der Ausbildung von Fokaladhäsionen benötigt wird. Die Phosphorylierung von Paxillin ist notwendig für die Bildung von Fokaladhäsionen und Migration von Zellen durch die Aktivierung von Rac1 [245-247].

- Talin und Vinculin

Einer der wichtigsten Schritte in der Formation von Fokaladhäsionen ist die Verbindung von ersten Integrinbündel mit dem Zytoskelett, welche über Talin hergestellt wird [248]. Fehlt Talin werden Fokaladhäsionen langsamer gebildet

und die Zellen weisen weniger Fokaladhäsionen auf [249, 250]. Dies kann mit der Fehllokalisation von Vinculin zusammenhängen. Nachdem Vinculin durch die Interaktion mit Talin seine Konformation ändert, verbindet es Actinfilamente mit der Zellmembran [251]. Beide Proteine sind essentiell für die Zellmigration, so führt die gestörte Lokalisation der Proteine zu einer Inhibition der Migration und einer Reduktion der Actinfilamente in Gliomzellen [252].

Um die Zellmigration zu ermöglichen, muss der Auf- und Abbau der Fokaladhäsionen dynamisch moduliert werden [253].

- **Aufbau der Fokaladhäsionen**

In den neuausgebildeten Zellfortsätzen bilden sich erste Kontakte mit der umliegenden Struktur. Diese ersten Kontakte werden Rac1 abhängig [254-256] aus Integrinen, Talin, Paxillin, sowie FAK gebildet [257, 258]. Anschließend binden Zyxin und Tensin an den bestehenden Komplex, um diesen zu stabilisieren [259]. Die Entwicklung und Stabilisation der Fokaladhäsionen während der Migration ist RhoA abhängig [254, 260]. Vinculin ist dabei ein wichtiger Bestandteil, um die Actinfilamente in den neugebildeten Zellfortsätzen zu verankern. Die Lokalisation von Vinculin ist zeitlich reguliert und korreliert mit dessen Fähigkeit an den Arp2/3 Komplex zu binden, um die Actinfilamente zu elongieren [261].

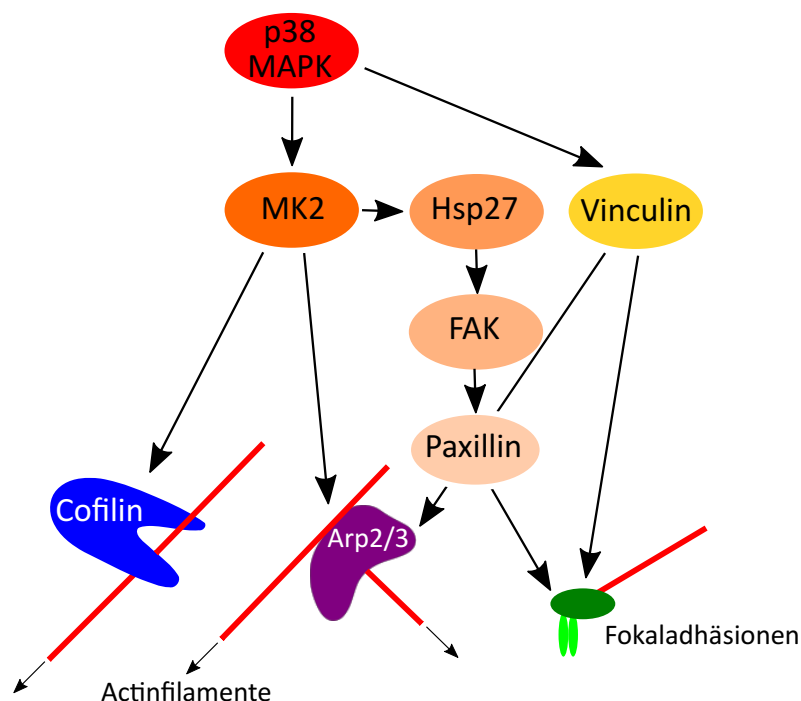
- **Abbau der Fokaladhäsionen**

Der Abbau von Fokaladhäsionen wird hauptsächlich durch zwei Proteine initiiert – Src und Calpain. Die Phosphorylierung von FAK an Y925 durch Src führt dazu, dass FAK aus den Fokaladhäsionen verdrängt und deren Abbau eingeleitet wird [262]. Calpain ist eine Protease, die essentiell für die Regulation von Vinculin und Zyxin ist. Fehlt Calpain so können Fokaladhäsionen nicht mehr abgebaut werden und wachsen stetig an [263].

### **1.9 p38 MAPK Signalweg**

p38 MAPK gehört zu der Familie der MAPK und ist an Signalkaskaden beteiligt, die als Auslöser externe Stimuli wie Cytokine, Hitzeschock und Strahlung haben und an der Regulation der Apoptose beteiligt sind [264, 265]. Des Weiteren hat p38 MAPK einen Einfluss auf die Zelldifferenzierung und das Zellwachstum. In dieser Arbeit steht allerdings der Einfluss von p38 MAPK auf die Zellmigration im Vordergrund. p38 MAPK beeinflusst die

Zellmigration über die Regulation der Dynamik von Actinfilamenten. p38 MAPK wird über die Mitogenaktivierten Proteinkinasen Kinase 3 und 6 (MKK3/6) aktiviert, welche wiederum zum Beispiel durch Rac1 und Cdc42 phosphoryliert werden [266, 267]. p38 MAPK hat einige nachgeschaltete Zielproteine wie zum Beispiel Transkriptionsfaktoren und andere Kinasen. Hierbei liegt im Bezug auf die Zellmigration die MAP Kinaseaktivierte Proteinkinase 2 (MAPKAPK2 oder MK2) im Fokus. MAPKAPK2 aktiviert einige Proteine, die die Dynamik der Actinfilamente und Fokaladhäsionen regulieren [268, 269]. Zum einen aktiviert MAPKAPK2 Cofilin, das wie vorher beschrieben eine wichtige Rolle in der Regulation der Actinfilamentdynamik spielt. Zum anderen interagiert MAPKAPK2 mit p16-Arc, einem Bestandteil des Arp2/3 Komplex [270, 271]. Des Weiteren wird das *Heat shock protein 27* (HSP27), ein Protein das sowohl in der Dynamik von Actinfilamenten als auch von Fokaladhäsionen eine Rolle spielt, durch MAPKAPK2 aktiviert [268, 272, 273]. HSP27 reguliert die Fokaladhäsionen zum Beispiel über Paxillin [274] und FAK [273]. Des Weiteren beeinflusst p38 MAPK sowohl die Dynamik der Actinfilamente als auch die der Fokaladhäsionen unabhängig von MAPKAPK2 über Vinculin [275]. Diese Zusammenhänge wurden in Abbildung 3 zusammengefasst.



**Abb. 3: Regulation des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen über den p38 MAPK Signalweg.** Die Aktivierung von p38 MAPK führt entweder indirekt oder direkt zu dem dynamischen Umsatz des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen.

### 2. Zielsetzung der Arbeit

Gliome stellen auf Grund ihres malignen Charakters mit einer hohen Infiltration des Gehirngewebes bis heute eine therapeutische Herausforderung dar. Die durchschnittliche Überlebensdauer ist abhängig von dem Schweregrad des Glioms. Patienten mit einem Glioblastom (WHO Grad IV) überleben durchschnittlich 12 Monate, während Oligodendrogliompatienten (WHO Grad II) die beste Prognose mit etwa 10 Jahren haben. Die aktuelle Therapie von Gliomen beinhaltet die chirurgische Resektion der Tumore, die Bestrahlung und die chemotherapeutische Behandlung mit TMZ. Das infiltrierende Wachstum von Gliomen führt jedoch dazu, dass sich zu dem Zeitpunkt der Diagnosestellung viele Gliomzellen bereits im umliegenden Gehirngewebe befinden und trotz aller Therapieversuche meistens ein Rezidiv entsteht. Das Gesamtüberleben wird durch die aktuellen Therapien bei zum Beispiel Glioblastompatienten lediglich um drei Monate verlängert. Trotz intensiver Forschung der molekularen Grundlagen von Gliomen, konnte bisher noch keine Therapie identifiziert werden, die das Überleben weiter verlängern konnten. Dennoch konnte die letzten Jahre gezeigt werden, dass molekulare und genetische Marker von Gliomen häufig mit einer besseren bzw. schlechteren Sensitivität gegenüber der Behandlung vor allem mit TMZ korrelieren. Das auf 1p34.1 codierte *PRDX1* wurde als funktioneller Marker, der in dem minimal deletierten Bereich des LOH 1p/19q liegt identifiziert. Der LOH 1p/19q wurde bereits als prognostischer Marker für Oligodendrogliome beschrieben und *PRDX1* als einer der funktionellen Faktoren beschrieben. Jedoch liegt der Forschungsschwerpunkt zu meist auf der Sensitivität gegenüber TMZ und dem Überleben von Patienten, die Einflüsse auf die Migration bzw. Infiltration der Gliomzellen in das Gehirngewebe wird dabei kaum untersucht. Diese Arbeit hatte das Ziel für den prognostischen und funktionellen Marker *PRDX1* die Auswirkungen auf die Gliomzellmigration zu identifizieren. Dies wurde mittels *in vitro* und vor allem durch die *ex vivo* Untersuchungen der Migration von *PRDX1* exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen adressiert. Für die Analyse der Migration von Gliomzellen über längere Zeit auf ihrer natürlichen ECM wurden organotypische Gehirnschnitte verwendet und eine Quantifizierungsmethode der infiltrierten Zellen etabliert. Des Weiteren hatte diese Arbeit das Ziel die für die Migration essentielle Funktion von *PRDX1* zu identifizieren und einen möglichen therapeutischen Rückschluss davon aufzuzeigen. Die verwendeten Methoden unterscheiden sich dabei nicht, lediglich die in die Zellen eingebrachten Konstrukte variierten. Es wurden neben *PRDX1*<sup>KD</sup> Konstrukten funktionell deletierte Varianten von *PRDX1* und verschiedene Inhibitoren verwendet. Letztendlich, soll der Einfluss von *PRDX1* auf die Migration von *PRDX1* beschrieben und die mögliche Anwendung dieser Ergebnisse für die Klinik identifiziert werden.



### 3. Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien waren von ihrem Reinheitsgrad *pro analysi* oder für spezielle Anwendung wie molekularbiologische Arbeiten oder Zellkulturarbeiten geeignet. Das Reinstwasser (ddH<sub>2</sub>O) wurde durch ein Wasseraufbereitungssystem des Typs TKA X-CAD (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) gewonnen.

#### 3.1 Verwendete Apparaturen, Reagenzien und Hilfsmittel

##### Datenbank

CBTRUS

##### Internet Adresse (http://)

<http://www.cbtrus.org>

Ensembl

[www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

NCBI Blast

[www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

PubMed Medline

[www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/)

qPrimerDepot

<https://primerdepot.nci.nih.gov>

R2: Genomics Analysis and Visualization

Platform

[www.hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi](http://www.hgserver1.amc.nl/cgi-bin/r2/main.cgi)

The RNAi Consortium

[www.broadinstitute.org/rnai/public/](http://www.broadinstitute.org/rnai/public/)

##### Enzyme

Arctic Phosphatase

##### Hersteller

New England Biolabs, Ipswich USA

DNase I

Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel  
Schweiz

Restriktionsenzyme

New England Biolabs, Ipswich USA

T4 DNA-Ligase

Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

##### Geräte

Biorack 6000

##### Hersteller

Statebourne Cryogenics, Washington UK

Brutschrank INB30

Memmert GmbH + Co. KG, Schwabach Deutschland

Brutschrank TH30

Edmund Bühler GmbH, Hechingen Deutschland

CO<sub>2</sub>-Inkubatoren

Binder GmbH, Tuttlingen Deutschland

Dry Block Heater

IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen Deutschland

Eppendorf Research® plus Pipette

Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

Gel iX20 Imager

INTAS Schience Imaging Instruments GmbH, Götting  
Deutschland

Intelli-Mixer RM-2

ELMI laboratory equipment, Riga Lettland

Leica CM1950 Cryostat

Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch  
Deutschland

Leica VT1000 S

Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch  
Deutschland

## Material und Methoden

---

Lightcycler® 480 Instrument II	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel Schweiz
LSM 780 Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland
Magnetrührer	Fisher Scientific GmbH, Schwerte Deutschland
Mitsubishi P93D Drucker	Mitsubishi Electric Europe B.V., Ratingen Deutschland
NanoDrop Lite Spectrophotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Pipetboy Pipettierhilfe	INTEGRA Biosciences Deutschland GmbH, Biebertal Deutschland
RTCA DP System	ACEA Bioscience, Inc., San Diego USA
SDS-PAGE System	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA
SRX 101A Film Processor	Konica Minolta, Tokyo Japan
Schüttler DOS-10L	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg Deutschland
Schüttler DRS-12	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg Deutschland
T100 Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA
TAK X-CAD System	Thermo Fisher Scientific, Waltham USA
Taumelrollschüttler RM5-30V CAT	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland
Tischzentrifugen	neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH, Heidelberg Deutschland
Trans-Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA
UltraVIEW VoX 3D Live Cell Imaging System	PerkinElmer, Inc., Waltham USA
Vortex Genie 2	Scientific Industries, Inc., New York USA
Zentrifuge 5430 R	Eppendorf AG, Hamburg Deutschland

### Kits und Mastermixe

Axio Observer Z1 Mikroskop  
CellTiter 96 AQueous One Solution  
Cell Proliferation Assay (MTS)  
First Strand cDNA Synthesis Kit  
GeneRuler DNA ladder mix  
Genomic DNA Clean & Concentrator  
GoTaq G2 Green Master  
iMark Microplate Reader  
Lipofectamine® 2000  
NucleoSpin Gel and PCR Clean-up  
NucleoBond PC500  
NucleoSpin Plasmid QuickPure  
NucleoSpin RNA

### Hersteller

Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland  
  
Promega GmbH, Madison USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Zymo Research Corporation, Irvine USA  
Promega GmbH, Madison USA  
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Macherey-Nagel, Düren Deutschland  
Macherey-Nagel, Düren Deutschland  
Macherey-Nagel, Düren Deutschland  
Macherey-Nagel, Düren Deutschland

## Material und Methoden

---

PageRuler Prestained Protein Ladder  
QuickChange XL Site-Directed  
Mutagenesis Kit  
Roti-Load 1  
SuperSignal West  
SYBR Green

Thermo Fisher Scientific, Waltham USA

Agilent Technologies, Inc., Santa Clara USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel  
Schweiz

### Reagenzien

2-Propanol  
Acrylamid wässrig 30%  
Adenanthin  
Adenosintriphosphat  
Agarose  
Ampicillin  
Ammoniumpersulfat (APS)  
Anisomycin  
B27 supplement  
Basis Fibroblastenwachstumsfaktor  
BD Matrigel™ Basement Membrane Matrix  
Bovines Serumalbumin (BSA)  
Bradford Reagenz  
Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>)  
cOmplete Protease Inhibitor Cocktail  
Tablets  
CytoSeal 60  
Desoxyribonukleosidtriphosphat (dNTP)  
Diamidinphenylindol (DAPI)  
DMEM Medium  
DMEM F12 Medium  
DMSO  
EBSS Medium  
Ethanol  
Ethidiumbromid  
Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA)  
Ethylenglykol  
Epidermaler Wachstumsfaktor  
Fötales Rinderserum (FBS)  
Glukose  
Glutamine  
Glycerin

### Hersteller

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
ChemFaces®, Hubei China  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Biomol GmbH, Hamburg Deutschland  
Becton, Dickinson and Company, New Jersey USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel  
Schweiz  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Genaxxon bioscience GmbH, Ulm Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Bernd Kraft GmbH, Duisburg Deutschland  
Biomol GmbH, Hamburg Deutschland  
Biochrom GmbH, Berlin Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Invitrogen™, Carlsbad USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland

## Material und Methoden

---

Hydroxyethylpiperazinylethansulfonsäure  
(HEPES)  
Magnesiumsulfat ( $\text{MgSO}_4$ )  
MEM  
Methanol  
Mowiol 4-88  
Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )  
Natriumdodecylsulfat  
Natriumfluorid ( $\text{NaF}$ )  
Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ )  
Neurobasalmedium  
LB-Medium  
LB Agar  
Optimem  
Paraformaldehyd (PFA)  
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)  
Polyethylenimin (PEI)  
Poly-L-Lysin  
Penicillin/Streptomycin  
Pferdeserum  
Polyvinylpyrrolidone (PVP40)  
Puromycin  
Saccharose  
SB203580  
SOB Medium  
Synth-a-freeze CTS  
Tetramethylethyldiamin (TEMED)  
Temozolomid (TMZ)  
Tris  
Triton X-100  
Trypsin-EDTA Gemisch 0.05%  
Trypsin inhibitor from chicken egg white  
Tween® 20

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
AppliChem GmbH, Darmstadt Deutschland  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Tocris Bioscience, Bristol England  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Thermo Fisher Scientific, Waltham USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA  
Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA

### Software

Adobe Reader 11.0.10  
ApE – A plasmid Editor  
EndNote X7.0.1  
FIJI 2.0.0-rc-14/1.49g  
GraphPad Prism 5.0b  
Illustrator CS5.1

### Hersteller

Adobe Systems, San Jose USA  
  
Thomson Reuter, Philadelphia USA  
[www.fiji.sc/Fiji](http://www.fiji.sc/Fiji)  
GraphPad Software, Inc., La Jolla USA  
Adobe Systems, San Jose USA

## Material und Methoden

---

Microplate Manager 6

Microsoft Excel für MAC 2011

Microsoft Word für MAC 2011

RTCA Software 2.0

ZEN Software

Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA

Microsoft, Redmond USA

Microsoft, Redmond USA

ACEA Bioscience, Inc., San Diego USA

Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland

### Sonstiges

µ-Slide 8 Well, ibiTreat

C57BL/6 Mäuse

Deckgläser und Objektträger

E. coli Stamm XL10

Falcon™ Cell Culture Inserts

Gewebekleber

HEK293T Zelllinie

Hs683 (ATCC® HTB-138™)

Hyperfilm ECL

Ln229 (ATCC® CRL-2611™)

NCH1681 Zelllinie

NCH612 Zelllinie

Neubauer Zählkammer

NOD/SCID/γ Mäuse (NSG)

Pasteurpipetten

Pipettenspitzen

Plasmide

Primer

PVDF Membran

Serologische Pipetten

Spritzen (vers. Größen)

T25 Suspensionskulturflaschen

T25 Zellkulturflaschen

T75 Suspensionskulturflaschen

T75 Zellkulturflaschen

TissueTek® O.C.T.™ Compound

Transwell Permeable Support 8 um

### Hersteller

ibidi GmbH, Martinsried (München), Deutschland

Jackson Laboratory, Maine USA

Gerhard Menzel B.V. & Co. KG, Braunschweig  
Deutschland

Agilent Technologies, Inc., Santa Clara USA

BD Biosciences, New Jersey USA

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland

American Type Culture Collection (ATCC),  
Manassas USA

American Type Culture Collection (ATCC),  
Manassas USA

GE Healthcare Chalfont St Giles, Großbritannien

American Type Culture Collection (ATCC),  
Manassas USA

Universitätsklinikum Heidelberg Kopfklinik,  
Deutschland

Universitätsklinikum Heidelberg Kopfklinik,  
Deutschland

Paul Marienfeld GmbH & Co. KG

Jackson Laboratory, Maine USA

nerbe plus GmbH, Winsen Deutschland

Addgene, Cambridge USA

Eurofins Genomics, Ebersberg Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt Deutschland

Corning Incorporated, Corning NY USA

B. Braun International, Melsungen Deutschland

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland

Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster Österreich

Sarstedt AG & Co., Nümbrecht Deutschland

Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster Österreich

Sakura Finetek Europe B.V. KvK, Alphen aan den Rijn  
Niederlande

ACEA Bioscience, Inc., San Diego USA

Zentrifugierröhrchen 15 ml und 50 ml

Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster Österreich

Zellkulturschalen

Greiner Bio-One GmbH, Kremsmünster Österreich

### 3.2 Puffer

#### Elektrodenpuffer für Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Der Puffer für die SDS-PAGE muss elektrisch leitfähig sein und setzt sich aus 19.2 mM Glycerin, 1% (w/v) SDS und 25 mM Tris in ddH<sub>2</sub>O zusammen.

#### Krebs Lösung (10x)

Die zehnfache Krebslösung ist die Ausgangslösung für die Puffer zur Isolation primärer Neuronen. Die Lösung setzt sich wie folgt zusammen: 1 M Natriumchlorid (NaCl), 0.05 M Kaliumchlorid (KCl), 0.01 M Natriumdihydrogenphosphat (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) und 0.15 M Glukose. Der pH Wert der Lösung wurde dem Wert von Säugetieren entsprechend auf 7.4 eingestellt.

#### Mowiol

Mowiol wurde dafür verwendet Deckgläser auf den Objektträgern anzubringen. Die Mowiollösung besteht aus 0.26 M Glycerin, 0.08 mM Mowiol 4-88 und 0.1 M Tris, was in ddH<sub>2</sub>O gelöst wurde. Zum Lösen muss das Gemisch mindestens vier bis fünf Stunden unter Hitzeeinfluss rühren, sodass auch das Mowiolpulver gelöst wird. Anschließend werden restliche feste Bestandteile durch Zentrifugation bei 5000 g für 15 min abgeschieden und der Überstand in Aliquotes eingefroren. Zur Verwendung wurde das Mowiol aufgetaut und auf Raumtemperatur gebracht, sodass es weniger viskos war und gut pipettiert werden konnte. Nach dem zusammenfügen von Deckglas und Objektträger wurde überschüssiges Mowiol entfernt und die Deckgläser zusätzlich am Rand mit durchsichtigem Nagellack fixiert. Die Proben wurden bei 4°C gelagert.

#### Tris-gepufferte Salzlösung (TBS)

Neben Phosphatgepufferter Salzlösung wurde auch Tris gepufferte Salzlösung verwendet. Diese bestand aus 50 mM Tris und 150 mM NaCl in ddH<sub>2</sub>O gelöst und auf einen pH von 7.6 eingestellt.

### 4. Methoden

In diesem Kapitel werden die verwendeten Methoden dieser Arbeit beschrieben. Die Protokolle der gängigen Standardverfahren wurden aus *Molecular Cloning* [276] und *Current Protocols in Molecular Biology* [277] entnommen.

#### 4.1 Zellkultursysteme

In dieser Arbeit wurden zwei etablierte hochgradige Gliomzelllinien der ATCC® verwendet. Zum einen wurde die Glioblastomzelllinie Ln229 (ATCC® CRL-2611™) benutzt. Diese Linie entstammt einem Glioblastom (WHO Grad IV), das einen normalen PTEN Status hat, jedoch eine Punktmutation in p53 (Prolin CCT zu Leucin CTT an Codon 98) und Deletionen von p16 und p14ARF aufweist. Die zweite verwendete Zelllinie Hs683 (ATCC® HTB-138™) entstammt einem Oligodendrogliom, das nach Branle et al., 2002 einen LOH<sub>1p/19q</sub> aufweist [278]. Jedoch zeigten die Untersuchungen von Dittmann et al., 2012, dass diese Zelllinie PRDX1 exprimiert [101], welches dem minimal deletierten Bereich eines LOH<sub>1p/19q</sub> zugeordnet werden konnten [97]. Beide Zelllinien (Ln229 und Hs683) wachsen adhärent und wurden nach Angaben der ATCC® ([www.ATCC.org](http://www.ATCC.org)) kultiviert.

- Kultivierung der ATCC® bezogenen Zelllinien

Die Ln229 und Hs683 Zelllinien wurden in einem Standardmedium kultiviert, welches aus Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) und 10% (v/v) fötales Kälberserum (FBS) bestand. Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und zwei Mal die Woche passagiert. Hierfür wurden die Zellen einige Minuten mit einer 0.05%igen Mischung aus Trypsin und Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) inkubiert. Sobald sich die Zellen abgelöst haben wurde die Reaktion mit Standardmedium gestoppt und die Zellsuspension für entweder Versuche oder für die Erhaltung als Stammkultur ausgesät, sodass zu keiner Zeit eine dichte Zellschicht entstand.

- Kryokonservierung der ATCC® bezogenen Zelllinien

Die dauerhafte Konservierung der Zellen wurde wie folgt durchgeführt: Die Zellen einer 70% konfluenten Petrischale mit einem Durchmesser von 10 cm wurde wie oben beschrieben abgelöst. Durch eine Zentrifugation bei 1500 rpm für 3 min wurden die Zellen pelletiert und das Trypsin und EDTA haltige Medium abgenommen. Das Zellpellet wurde in einer Lösung aus 47.5% (v/v) DMEM, 47.5% (v/v) FBS und 5% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert und über 24 Stunden auf -80°C herunter

gekühlt. Anschließend wurden die Zellen für die längerfristige Konservierung bei -196°C aufbewahrt.

Des Weiteren wurden primäre Zelllinien verwendet, die freundlicherweise von Prof. Dr. Christel Herold-Mende zur Verfügung gestellt wurden. Es handelte sich dabei um zwei Zelllinien, NCH612 und NCH1681, welche aus WHO Grad III Gliomen stammen. Beide Zelllinien wuchsen als Suspensionskultur und wurden nach Protokoll der Kopfklinik Heidelberg kultiviert:

- **Kultivierungsmedium**

Das Kultivierungsmedium basierte auf Dulbecco's Modified Eagle's Medium: Nutrient Mixture F-12 (DMEM F-12), das mit 0.5% (v/v) B27 Zusatz, 12 µM basis Fibroblastenwachstumsfaktor (bFGF) und 6 µM epidermaler Wachstumsfaktor (EGF) und 1% (v/v) Penicillin und Streptomycin (P/S) angereichert wurde.

- **Passagieren der Zellen**

Die Zellen sind ein Mal die Woche 1:3 passagiert worden. Hierzu wurden die Sphären in 15 ml Reaktionsgefäße überführt, welche für 10 min ruhen gelassen wurden. Dabei setzten sich die lebenden Zellen durch Absinken am Boden des Gefäßes ab und konnten so von den abgestorbenen Zellen abgetrennt werden. Das überschüssige Medium wurde verworfen und die Sphären wurden in neuen Kultivierungsmedium aufgenommen. Durch mehrfaches Auf und Ab-Pipettieren wurden die Zellen der Sphären manuell vereinzelt. Ein Drittel der Lösung wird in eine neue Flasche überführt und mit frischem Medium aufgefüllt. Die Zellen werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

- **Kryokonservierung der Zellen**

Für die Kryokonservierung wurden die Sphären einer T75 Suspensionsflasche in Synth-a-freeze Einfriermedium nach Herstellerangaben eingefroren. Die Zellen werden zunächst mit einer Geschwindigkeit von 1°C pro Minute auf -80°C herab gekühlt und anschließend für die Langzeitkonservierung bei -196°C aufbewahrt.

### **4.2 Modulation der Proteinexpression über lentivirale Transduktion**

In Rahmen dieser Arbeit wurde die Expression von PRDX1 und p38 MAPK über artifizielle DNA Sequenzen moduliert, die über Lentivirus basierende Vektorsysteme eingebracht wurden. In den folgenden Absätzen werden die Vorgehensweisen und Anwendungen für die einzelnen Konstrukte beschrieben, die Plasmidkarten befinden sich im Anhang. Neben der



DNA Sequenz trugen die verwendeten Plasmid die Gene für die Puromycin-N-acetyltransferase und  $\beta$ -Lactamase. Die  $\beta$ -Lactamase ist ein bakterielles Enzym, welches durch Hydrolyse des  $\beta$ -Lactam Rings von Ampicillin, die Wirkung des Antibiotikum blockiert, sodass eine Resistenz gegen Ampicillin entsteht [279]. Die Puromycin-N-acetyltransferase wird von den Bakterien *Streptomyces alboniger* als Schutzmechanismus gegen das von ihnen synthetisierte Antibiotikum Puromycin hergestellt, welches die Proteinbiosynthese inhibiert und so auch als Toxin auf nicht bakterielle Zellen wirkt [280]. Die beschriebenen Resistenzgene wurden für die Selektion im späteren Verlauf benötigt und ist den nachfolgenden Absätzen zu entnehmen.

### 4.2.1 Reduktion der Genexpression durch das Einbringen von *small hairpin* RNA (shRNA) Sequenzen

Die Reduktion der Genexpression basierte auf dem Einbringen von shRNA Sequenzen, die als Zielsequenzen die Boten-RNA (mRNA) entsprechender Gene hatten [281]. Das Vektorsystem das hierfür verwendet wurde basierte auf dem lentiviralen pLKO Plasmid [282].

- Reduktion der Expression von PRDX1

Das Plasmid, welches die shRNA gegen die mRNA von *PRDX1* trug, wurde von Sigma-Aldrich kommerziell bezogen und entsprach der zuvor von L. Dittmann und Kollegen verwendeten Sequenz (TRCN0000029511) [101]. Die Expression der shRNA wurde durch einen U6 Promotor gesteuert, welcher die Transkription durch die RNA Polymerasen des Typ III initiiert [283]. Das Plasmid konnte nach der Amplifikation und Isolation direkt für die Herstellung der Lentiviren verwendet werden.

- Reduktion der Expression von p38 MAPK

Die shRNA gegen *MAPK14* (p38 MAPK) wurde ebenfalls über einen pLKO Vektorsystem in die Gliomzellen eingebracht. Ausgehend von einem pLKO Plasmid, das zunächst noch keine shRNA enthielt, wurde das Konstrukt mit der shRNA gegen *MAPK14* (p38 MAPK) nach einem Protokoll der Reihe Molecular Cloning kloniert [276]. Hierzu wurden die kommerziell erworbenen Oligonukleotide hybridisiert. Im Folgenden wird das verwendete Protokoll erläutert. Die Sequenzen entsprachen der Broad Institute Sequenz für p38 MAPK (TRCN0000010052; Sinnstrang (Fwd) 5' CCGGCCATGTTTCAGTTCCTTATCTACTCGAGTAGATAAGGAACTGAAC

ATGGTTTTTG 3' und Komplementärstrang (Rev) 5'  
AATTCAAAAACCATGTTTCCTTATCTACTCGAGTAGATAAGGAACTGAA  
CATGG. Für die Hybridisierung wurden je 1 pmol pro *Primer* mit 1x Hybridisierungspuffer (1 mM Tris, 1 mM EDTA und 0.1 mM NaCl) versetzt. Um sekundäre Strukturen in den Oligonukleotiden aufzulösen wurde die Mischung zunächst für 5 min auf 95°C erhitzt. Anschließend wurden die Proben im ausgeschalteten Heizblock bis auf 25°C abkühlen gelassen und bei dieser Temperatur für weitere 15 min inkubiert. Das pLKO Plasmid wurde für die Ligation mit dem DNA Fragment vorbereitet, indem es mit den Restriktionsenzymen *AgeI* (A/CCGGT) und *EcoRI* (G/AATTC) nach Herstellerangaben für 2 Stunden bei 37°C inkubiert wurde. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend mit dem NucleoSpin Gel und PCR Clean-up Kit (Macherey-Nagel, Düren Deutschland) gereinigt und mit dem hybridisierten Fragment über Nacht bei Raumtemperatur ligiert (s. Unterpunkt Ligation). Anschließend wurde mit dem Ligationsansatz eine Transformation in *Escherichia coli* (*E. coli*; XL10-Gold Ultracompetent Cells) durchgeführt (s. Unterpunkt Transformation). Das weitere Vorgehen ist analog in allen verwendeten Plasmiden und ist in dem Unterpunkt Transformation erklärt.

### 4.2.2 Expression von PRDX1 in Gliomzellen, die endogen kein PRDX1 exprimieren

Die Expression von PRDX1 musste lediglich in einer Zelllinie wiederhergestellt werden, dabei handelte es sich um die niedergradige NCH1681 Gliomzelllinie. Hierzu wurde das *PRDX1* Gen in einem lentiviralen pLVX Plasmid [284] von der Zentraleinheit *Genomics & Proteomics Core Facilities* des DKFZs bezogen. Die Transkription von *PRDX1* wurde durch ein Cytomegalovirus (CMV) Promotor in humanen Zellen initiiert [285]. Das Plasmid konnte nach der Amplifikation und Isolation direkt für die Herstellung der Lentiviren verwendet werden.

### 4.2.3 Expression verschiedener PRDX1 Varianten

Des Weiteren wurden funktionelle Mutanten von PRDX1 verwendet. Hierbei wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt, die im Folgenden beschrieben werden:

- Expression von funktionellen PRDX1 Mutanten in NCH1681 Gliomzellen  
In die NCH1681 konnte analog zu dem nicht mutierten PRDX1 Gen ein pLVX Plasmid, das die entsprechende Mutante trug, verwendet werden, da diese Zellen keine endogene PRDX1 Expression aufwiesen. Hierzu wurden ausgehend von dem pLVX-PRDX1 Plasmid die Punktmutationen mit dem *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara USA) nach Anleitung eingebracht. Es wurden zwei funktionelle Mutanten über jeweils einen Basenaustausch hergestellt. Durch den Austausch einzelner Basen wurde im Protein ein funktionelles Cystein mit Serin getauscht. Das Cystein an Stelle 52 (Cys52) ist für die Peroxidaseaktivität essentiell und interagiert für die Wiederherstellung mit dem Cys173. Der Austausch von Cys52 inaktiviert somit die Peroxidaseaktivität von PRDX1 (PRDX1<sup>C52S</sup>). Die andere Mutante ist ein Austausch des Cys83, welchem eine Chaperoneaktivität zugeschrieben wird (PRDX1<sup>C83S</sup>). Das *QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit* (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara USA) beruht auf einer Polymerasekettenreaktion (PCR) [286] bei der die Primer die Punktmutation in das bestehende Plasmid einbringt [287]. Das pLVX-PRDX1 Plasmid wurde mit den entsprechenden Primerpaaren zu dem auf einer *PfuUltra* HF DNA Polymerase basierenden PCR Reaktionsansatz hinzugegeben.

Verwendete Primerpaare (5' nach 3'):

PRDX1<sup>C52S</sup> Fwd: ATCTCCGTGGGGCTCACAAAGGTGAAGTCAAG

Rev: TCTTGACTTCACCTTTGTGAGCCTCCACGGAGAT

PRDX1<sup>C83S</sup> Fwd: GACCCATGCTAGATGACTGAAGTGAGAATCCCAAG

Rev: CTGTGGATTCTCACTTCAGTCATCTAGCATGGGTC

Die DNA Amplifikation mittels PCR erfolgte nach diesem Protokoll:

- Initiale Denaturierung – 1 min bei 95°C
- Amplifikation (18 Wiederholungszyklen)
  - Denaturierung – 50 s bei 95°C
  - Primerhybridisierung – 50 s bei 60°C
  - Elongation – 1 min pro Kilobasenpaar bei 68°C
- Finale Elongation – 7 min 68°C

Die Elongationszeit für das pLVX-*PRDX1* Plasmid betrug 9 min, da dieses Plasmid etwa 9 kb lang war. Durch die PCR Reaktion fehlten den neusynthetisierten Plasmiden die Methylierungen, sodass das ursprüngliche Plasmid über ein Restriktionsenzym (*Dpn I*), das spezifisch für methylierte DNA ist, abgebaut werden konnte. Anschließend wurde das Plasmid in *E. coli* (XL10-Gold Ultracompetent Cells) eingebracht (s. 3.2.5 Transformation).

- Einbringen der funktionellen *PRDX1* Mutanten in die ATCC® bezogenen Gliomlinien

Des Weiteren wurden die funktionelle Mutanten von *PRDX1* in Kombination mit einer shRNA gegen die mRNA des endogenen *PRDX1* in Ln229 und Hs683 Zellen eingebracht, sodass die endogene *PRDX1* Expression durch die der Mutanten ersetzt wurde. Das hierfür verwendete Plasmid wurde freundlicherweise von Rebecca van Laack und Peter Wirthschaft zur Verfügung gestellt. Alle der *PRDX1* Mutanten Plasmide trugen eine shRNA gegen den 5' untranslatierten Bereich (UTR) der endogenen *PRDX1* mRNA, die durch einen U6 Promotor gesteuert wurde. Zusätzlich trugen die Plasmide je eine Variante von *PRDX1* als Gen, welches durch einen CMV Promotor reguliert wurde. Es wurden vier *PRDX1* Varianten verwendet, als Kontrolle das unveränderte *PRDX1* (*PRDX1*<sup>WT</sup>) und die drei *PRDX1* Mutanten – *PRDX1*<sup>C52S</sup>, *PRDX1*<sup>C83S</sup> und *PRDX1*<sup>C173S</sup>.

#### 4.2.4 Ligation von DNA Sequenzen

Bei einer Ligation handelt es sich um die katalysierte Verknüpfung von DNA Fragmenten über deren komplementäre Enden. Das katalysierenden Enzym ist dabei die sogenannte Ligase, die die Phosphodiesterbindung zwischen den Fragmenten ausbildet [288]. Die Plasmide wurden mit den selben Restriktionsenzymen wie die DNA Fragmente linearisiert, sodass komplementäre Enden entstanden. Die so vorbereiteten DNA Fragmente wurden dem Reaktionsgemisch aus einem spezifischem Puffer, PEG2000 und der Ligase nach Herstellerangaben zugefügt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Das Verhältnis von Plasmid und Insert wurde wie folgt berechnet:

$$ng_{Insert} = \frac{4 \times ng_{Vektor} \times bp_{Insert}}{bp_{Vektor}}$$

### 4.2.5 Transformation von Plasmiden in *E. coli*

Die Transformation ist das Einbringen von DNA in kompetente Bakterien, in dieser Arbeit wurden hierfür kompetente *E. coli* Bakterien verwendet. Die Transformation wurde nach einem bereits etablierten Standardprotokoll durchgeführt [289]. Die aufgetauten kompetenten Bakterien wurden im Verhältnis 10:1 mit den entsprechenden Plasmiden bzw. Ligationen versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde ein Hitzeschock für 90 s bei 42°C durchgeführt, welcher anschließend durch die Abkühlung auf Eis gestoppt wurde. Nach einer Regenerationszeit von einer Stunde in *Super Optimal Broth* (SOB) Medium bei 37°C wurden die Bakterien auf Ampicillin-haltigen *Lysogeny Broth* (LB)-Agarplatten ausgestrichen, da alle verwendeten Plasmide eine Ampicillinresistenz trugen. Das SOB Medium setzte sich aus 0.5% (w/v) Hefeextrakt, 2% (w/v) Trypton, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl und 10 mM MgSO<sub>4</sub> zusammen. Die LB-Agarplatten wurden auf Grundlage des LB-Mediums (0.5% Hefeextrakt, 0.1% Trypton und 0.1% NaCl jeweils (w/v)) als Nährboden für die Bakterienkultur hergestellt. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und von den gewachsenen Kolonien am nächsten Tag zufällig einige ausgewählt, um diese als Suspensionskultur in Ampicillin haltigem LB-Medium zu vermehren. Die Bakterien wurden durch eine Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 min pelletiert und die Plasmide mit Hilfe des *NucleoSpin Plasmid QuickPure Kits* (Macherey-Nagel, Düren Deutschland) nach Anleitung isoliert. Die Klone bei denen die gewünschte Sequenz wie zum Beispiel die Punktmutationsvarianten von PRDX1 durch Sequenzierung bestätigt werden konnte, wurden anschließend für die Vervielfältigung der Plasmide verwendet. Hierzu wurden die Bakterienklone in einem größeren Ansatz (bis zu 200 ml) als Suspensionskultur in Ampicillin haltigen LB-Medium wachsen gelassen. Die Bakterien wurden ebenfalls pelletiert und die Plasmide mit dem *NucleoBond PC500* (Macherey-Nagel, Düren Deutschland) nach Anleitung isoliert.

### 4.2.6 Produktion der Lentiviren

Die Produktion von Lentiviren wurde in HEK293T Zellen nach dem Protokoll von G. Tiscornia und Kollegen durchgeführt [290]. Die HEK293T Zellen wurden für die Virusproduktion ausgesät, sodass die Zellschicht zu etwa 70% dicht war. In dieser Arbeit wurden für die Virusproduktion pro Virus jeweils drei Petrischalen mit einem Durchmesser von 15 cm verwendet. Vor der Transfektion der Zellen wurde das Medium erneuert und die Transfektionslösung anschließend tropfenweise zugegeben. Diese setzte sich aus zwei Lösungen zusammen. Die erste Lösung

bestand aus je 16 µg/ml des pMD2.G Plasmids und des psPAX2 Plasmids und 32 µg/ml des pLKO oder pLVX Plasmids verdünnt in Optimem Medium. Die zweite Lösung setzt sich aus Polyethylenimin (PEI) und Optimem Medium im Verhältnis 1:3 zusammen, dementsprechend enthält die Lösung 192 µg/ml PEI. Die Lösungen wurden zu gleichen Teilen gemischt und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert bevor sie gleichmäßig auf den HEK293T Zellen verteilt wurde. Die verwendeten pLKO und pLVX Plasmide enthalten keine Gene für die Hüllproteine der Viren, da es sich um nicht replikationskompetente Viren handelt. Aus diesem Grund mussten für die Virusproduktion in HEK293T Zellen die Hüllproteine auf zusätzlichen Plasmiden hinzugegeben werden, dies waren die pMD2.G und psPAX2 Plasmide. Nach zweitägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium der Zellen abgenommen und bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert, sodass die Fragmente der apoptotischen HEK293T Zellen entfernt wurden. Restliche Zellfragmente wurden durch Filtration durch einen 45 µm Spritzenfilter entfernt. Der so aufbereitete Überstand wurde bei 4°C und 25.000 rpm für 1.5 Stunden zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das getrocknete Viruspellet in Optimem gelöst. [281, 290]. Die Gliomzellen wurden im Verhältnis 1:1000 mit dem konzentrierten Virus infiziert und nach zwei tägiger Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde das Medium der Zellen getauscht und mit 2 µM Puromycin versetzt. Die infizierten Zellen exprimieren neben den eingebrachten Zielgenen die Puromycin-N-acetyltransferase, die sie resistent gegen das eingesetzte Puromycin machte. Dies hatte zur Folge, dass nur die infizierten Zellen unter dem Puromycin Selektionsdruck überlebten und alle anderen abstarben.

### 4.3 Bestimmung der Zellviabilität und Proliferation

#### 4.3.1 CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay

Der CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay (Promega GmbH, Madison USA) wurde verwendet, um die Zellproliferation und –viabilität zu testen. Der Versuch wurde in einem 96-well Plattenformat nach Herstellerangaben durchgeführt. Hierzu wurden 1000 Zellen pro Vertiefung ausgesät und anschließend fünf Tage mit TMZ oder Ade, einem PRDX1 Inhibitor, behandelt entsprechend des Protokolls der Studie von L. Dittmann [101]. Die CellTiter 96® AQ<sub>ueous</sub> One Solution Cell Proliferation Assay Lösung wurde wie in der Anleitung beschrieben im Verhältnis 1:10 in jede Vertiefung gegeben und zwei bis vier Stunden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Sobald in den Kontrollbedingungen ein deutlicher Farbumschlag von Gelb zu einem dunklen Violett zu erkennen war,

konnte die Absorption bei 490 nm mit dem iMark *Microplate Reader* bestimmt werden. Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau des unabhängiger Zweistichproben-t-Tests war  $p = 0.05$ .

### 4.3.2 Proliferationsanalyse

Zusätzlich wurde in dieser Arbeit die Proliferation der Hs683 Zellen auf untersucht, dabei wurden  $1.5 \times 10^4$  Zellen in Petrischalen mit einem Durchmesser von 6 cm ausgesät. Die Zellanzahl wurde nach der Überführung der Zellen in Suspension durch Auszählen mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Dies ermöglicht die Aufzeichnung der Zellzahlzunahme über einen beliebigen Zeitraum. Die statistische Auswertung wurde mit der GraphPad Prism Software (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) durchgeführt. Das Signifikanzniveau des unabhängiger Zweistichproben-t-Tests war  $p = 0.05$ .

## 4.4 Expressionsanalyse von Genen mittels qualitativer *real-time* PCR (qPCR)

Die Expressionsniveaus verschiedener Gene wurden über die Anzahl der mRNA Kopien quantifiziert. Diese Methode kann verwendet werden, um eine Regulierung der mRNA durch shRNA Expression oder die Überexpression eines Gens nachzuweisen.

### 4.4.1 Isolierung und Reinigung der RNA aus Zellpellets

Die RNA der Zellen wurde nach Anleitung mit dem *NucleoSpin RNA Kit* (Macherey-Nagel, Düren Deutschland) aus den Zellen isoliert. Diese Isolation beruhte auf der Bindung von Nukleinsäuren an eine Silica Membran. Die aus dem Zelllysate isolierten und an die Membran gebundenen Nukleinsäuren bestanden aus einer Mischung aus DNA und RNA, sodass die DNA zunächst durch die Inkubation mit einer DNase eliminiert werden mussten. Anschließend konnte die RNA nach einigen Waschschritten eluiert werden und die Konzentration mit dem *NanoDrop Lite* Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) UV-spektroskopisch bestimmt werden. Hierbei wurden die Absorptionsspektren bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm ( $A_{260}$  und  $A_{280}$ ) bestimmt und die Konzentration und Reinheit der RNA direkt vom Gerät berechnet. Die Berechnung beruht jedoch auf den allgemein angenommenen Werten für den Umrechnungsfaktor [277].

- 1 OD<sub>260</sub> entspricht 40 µg RNA (Umrechnungsfaktor 40)
- Die RNA Isolation ist rein, wenn die Ratio von  $A_{260}$  und  $A_{280}$  einem Wert von 2 entspricht.

- Hierbei ist ein  $OD_{260}$  als die Oligonukleotidmenge definiert, die in 1 ml gelöst und einer Schichtdicke von 1 cm eine Extinktion bei 260 nm Wellenlänge von eins ausweist.

### 4.4.2 Synthese der komplementären DNA (cDNA) aus mRNA

Die Amplifikation der mRNA war nötig um ein doppelsträngiges DNA Fragment aus der einzelsträngigen mRNA herzustellen, welches für die spätere qPCR benötigt wurde. Hierzu wurde von jeder RNA die gleiche Menge für die cDNA Synthese eingesetzt, damit von dieser gleiche Konzentrationen für die qPCR vorliegen. Die cDNA Synthese wurde nach Anleitung des *First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) durchgeführt. Zunächst wurde eine Mischung aus zufälligen *Primern* gegen häufige RNA Sequenzen mit der isolierten mRNA bei 65°C hybridisiert. Anschließend wurde die cDNA durch die Reverse Transkriptase synthetisiert und zum Abschluss vollständig elongiert. Die daraus entstandene cDNA wurde auf eine durchschnittliche Endkonzentration von 10 ng/µl mit ddH<sub>2</sub>O verdünnt.

### 4.4.3 Bestimmung der mRNA Menge durch qPCR

Die qPCR ist eine effiziente Methode, um die Menge einer spezifischen Nukleotidsequenz zu bestimmen. Hierbei wird die Produktzunahme über die Detektion der Fluoreszenz gemessen, welche im log-linearen Bereich der Reaktion direkt proportional zur Produktmenge ist [291, 292].

Dies wird mathematisch wie folgt in Zusammenhang gesetzt:

$$N_n = N_0 \times \varepsilon^n$$

Hierbei wird die Gesamtproduktmenge nach  $n$  Zyklen ( $N_n$ ) gleich gesetzt mit der Ausgangsmenge ( $N_0$ ) multipliziert mit der Primereffizienz ( $\varepsilon$ ) hoch den benötigten Zyklen, um in die log-lineare Phase der Reaktion einzutreten.

Das produktabhängige Fluoreszenzsignal wird über den in die DNA interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* generiert und mit dem Lightcycler® 480 (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel Schweiz) aufgezeichnet. Die Besonderheit des *SYBR-Green* Farbstoffs ist, dass er nach Interkalierung in doppelsträngige DNA mit einer Wellenlänge 497 nm angeregt werden kann und mit einer Emissionswellenlänge von 520 nm fluoresziert.

Für die Messung der in cDNA umgeschriebenen mRNA wurden 10 ng cDNA mit 1 pmol der Primerpaare in einem 10 µl Reaktionsansatz mit *SYBR-Green Master Mix* (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel Schweiz) über 45 Zyklen amplifiziert. Die im *SYBR Green Master Mix* enthaltene *HotStart* Polymerase



benötigte einen initialen Aktivierungsschritt bei 95°C für 5 min. Dem anschlossen folgte die Amplifikationsphase. Diese setzte sich aus einem 45-fach wiederholten Zyklus aus Denaturierung (10s bei 95°C), Hybridisierung der *Primer* (10s bei 60°C) und Elongation (30s bei 72°C) zusammen. Um zu gewährleisten, dass die amplifizierten PCR Fragmente den gewünschten Amplikons entsprechen, wurde bei jeder qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Temperatur schrittweise (1°C/s) von 65°C auf 97°C erhöht wurde.

Die Auswertung wurde nach der von M. Pfaffl beschriebenen Methode durchgeführt [293]. Dabei wurde zunächst die Effizienz der *Primer* aus einer Verdünnungsreihe mit folgender Formel bestimmt:

$$\varepsilon = 10^{\left(\frac{-1}{\text{Steigung}}\right)}$$

Hierbei ergab sich die Steigung aus der logarithmischen Auftragung der eingesetzten cDNA Menge und des Zyklus an dem der Schwellenwert zum Eintritt in die log-lineare Phase der Reaktion erreicht wurde ( $C_p$ ). Zu der relativen Quantifizierung wurden die effizienzkorrigierte Expressionen des Zielgenes mit einem stabil exprimierten Gen (ein sogenanntes *Housekeeping*-Gen) in Relation gesetzt. In dieser Arbeit zeigte sich das Gen der Phosphoglyceratkinase (PGK) als äußerst konstant.

$$\text{Ratio} = \frac{\varepsilon_{\text{Zielgen}}^{-C_p}}{\varepsilon_{\text{Referenzgen}}^{-C_p}}$$

Jede Messung wurde in technischen und biologischen Triplikaten durchgeführt. Zur statistischen Analyse zwischen den Proben wurden die biologischen Triplikate mittels einem unabhängigen Zweistichproben-t-Test verglichen (Signifikanzgrenze  $p = 0.05$ ).

#### 4.4.4 Primersysteme für die qPCR (5' → 3')

Als Datenbank für die Primersuche diente die qPrimerDepot Primerdatenbank (<https://primerdepot.nci.nih.gov>). Die darin gefundenen Primer wurden über NCBI BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) verifiziert [294]. Es wurden dabei die folgenden Anforderungen an die *Primer* beachtet [277]:

- Keine selbstkomplementären Bereiche
- Nur eine Bindungsstelle in der cDNA
- Die Primerpaare sollten gleiche Schmelztemperaturen haben
- Keine Ausbildung von Sekundärstrukturen wie *stem-loops* oder *hairpins*
- Die resultierenden Produkte sollten Fragmentlängen von 100-300 bp aufweisen

Da es sich in diesem System um die Analyse von Gentranskripten handelt, sollten die *Primer* zusätzlich eine Exon-Exon-Grenze einschließen. Dies verhinderte, dass die *Primer* an möglicherweise enthaltene genomische DNA banden und dieses Produkt ebenfalls amplifiziert wurde. Die Synthese und Aufreinigung der *Primer* erfolgte über die Firma Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland).

PGK	<i>Fwd</i>	CAGCTGCTGGGTCTGTCA	Effizienz	2.09
	<i>Rev</i>	GCTGGCTCGGCTTTAACC		
PRDX1	<i>Fwd</i>	CAGCCTGTCTGACTACAAAGG	Effizienz	2.09
	<i>Rev</i>	CCAGTCCTCCTTGTTTCTTAG		
PRDX2	<i>Fwd</i>	CAGACGAGCATGGGGAAG	Effizienz	1.97
	<i>Rev</i>	ACGTTGGGCTTAATCGTGTC		
PRDX3	<i>Fwd</i>	TGCTGTAGGACGGTTGCTC	Effizienz	2.79
	<i>Rev</i>	AAGCTCGTTCTTCCACATGC		
PRDX4	<i>Fwd</i>	TGCTGTAGGACGGTTGCTC	Effizienz	1.8
	<i>Rev</i>	AAGCTCGTTCTTCCACATGC		
PRDX5	<i>Fwd</i>	GTCCGCAGTTTCAGCAGAG	Effizienz	1.97
	<i>Rev</i>	CCCCTTCAAACACCTCCAC		
PRDX6	<i>Fwd</i>	TCAATAGACAGTGTTGAGGACCA	Effizienz	1.79
	<i>Rev</i>	TTTCTGTGGGCTCTTCACAA		
p38 MAPK	<i>Fwd</i>	TGGAGAGCTTCTTCACTGCC	Effizienz	2.08
	<i>Rev</i>	CGAGCGTTACCAGAACCTGT		
MAPKAPK2	<i>Fwd</i>	CAGTGCAGCTCCACCTCC	Effizienz	2.08
	<i>Rev</i>	GGCATCAACGGCAAAGTT		

### 4.5 Analyse der Proteinexpressionsleveln in Gliomzellen

Die qPCR Ergebnisse wurden per *Western Blot* Analyse verifiziert. Hierzu werden die Proteine über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mittels *Western Blot* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF) Membran überführt [277].

#### 4.5.1 Isolation von Proteinen aus Zellpellets

Für die Proteinisolierung mussten die Zellen lysiert werden, in dieser Arbeit wurde hierzu ein auf 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) basierender Lysepuffer verwendet (0.05 M HEPES, 0.25 M NaCl, 0.5% (v/v) Triton X-100, 5% (v/v) Glycerin, 2 mM EDTA, 1 mM Natriumfluorid (NaF), 1 mM Natriumorthovanadat ( $\text{Na}_3\text{VO}_4$ ) und eine Roche Protaseninhibitortablette nach Anleitung). Die Zellfragmente wurden mittels Zentrifugation abgetrennt, sodass die reine Proteinlösung in ein neues Reagiergefäß überführt werden konnte. Die Proteinkonzentration der Lösung wurde über einen chromatischen Ansatz mit

dem Bradford Reagenz (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA) bestimmt. Hierzu wurde die verdünnte Reagenzlösung in einer Mikrotiterplatte verteilt und mit der Proteinlösung vermischt. Nach fünf minütiger Inkubationszeit konnte die Absorption bei 595 nm am iMark *Microplate Reader* (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules USA) gemessen werden. Eine BSA basierende Standardkurve wurde für die Evaluation der Proteinmengen hinzugezogen. Die Proben wurden so angesetzt, dass diese eine Konzentration von 3 µg/µl hatten und wurden zusätzlich mit Roti-Load 1 Ladepuffer (Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe Deutschland) versetzt. Zur Denaturierung der Proteinstrukturen wurden die Proben für 5 min auf 95°C erhitzt.

### 4.5.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Auftrennung der Proteine wurden Polyacrylamidgele verwendet, die in dieser Arbeit eine Polyacrylamidkonzentration von 11% hatten. Zunächst wurde das Trenngel hergestellt. Hierfür wurde 37% (v/v) ddH<sub>2</sub>O, 37% (v/v) einer 30%igen Acrylamidlösung, 25% (v/v) 1.5 M Tris (pH 8.8), 0.01% (w/v) SDS, 0.01% (v/v) Tetramethylethylendiamin (TEMED) und 0.1% (v/v) Ammoniumpersulfat (APS) gemischt und zwischen die vorgespannten Glasplatten gegeben. Nach der Polymerisation wurde das Sammelgel oben aufgeschichtet. Hierzu wurde eine Lösung aus 57% (v/v) ddH<sub>2</sub>O, 17% (v/v) einer 30%igen Acrylamidlösung, 25% (v/v) einer 0.5 M Tris (pH 6.8), 0.01% (w/v) SDS, 0.01% (v/v) TEMED und 0.1% (v/v) APS hergestellt. Diese wurde auf das zuvor polymerisierte Trenngel gegeben und die Taschen für die Proben eingefügt. Nachdem das Gel vollständig polymerisiert war, konnten 30 µg der Proteinproben in die vorgefertigten Vertiefungen des Sammelgels gegeben werden. Während sich die Proben im Sammelgel befanden wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt, sodass die Proteine gleichzeitig in das Trenngel übertraten und anschließend eine gleichmäßige Trennung erfolgen konnte. Nach dem Erreichen des Trenngels wurde die Spannung auf 120 Volt erhöht.

### 4.5.3 Western Blot

Der *Western Blot* ist eine Methode, um Proteine aus einem Polyacrylamidgel auf eine Membran zu transferieren. Die vollständig aufgetrennten Proteine wurden mittels *Semidry Western Blot* Aufbau auf eine PVDF-Membran transferiert. Hierbei wurde der Gel-Membranstapel von jeweils drei in Towbin-Puffer getränkten Filterpapieren oben und unten umschlossen. Der Towbin-Puffer bestand aus 19.2 mM Glycerin, 25 mM Tris und 20% (v/v) Methanol und musste

vor der Verwendung eine Temperatur von 4°C haben. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde ein zu dem Gel-Membranstapel senkrecht stehendes elektrisches Feld angelegt, sodass die Proteine in Richtung der Anode auf die Membran wanderten. Das elektrische Feld wurde für 30 min mit 25 Volt und 1 Ampere angelegt.

Die Detektion der Proteine beruhte auf der Biolumineszenz, die bei der Umsetzung von Luminol durch eine Peroxidase des Meerrettichs entsteht. Hierzu wurden zunächst die, unspezifischen Bindungsstellen der Membran mit einer Lösung aus 5% (w/v) Rinderalbumin (BSA) in TBS-T (50 mM Tris (pH 7.6), 150 mM NaCl und 0.1% (v/v) Tween20) für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert. Der Primärantikörper wurde in der Blockierungslösung im Verhältnis 1:1000 verdünnt und die Membranen über Nacht bei 4°C unter ständigem Schütteln inkubiert. Nach einigen Waschschritten mit TBS-T wurden die Membranen anschließend mit den sekundären Antikörpern, die spezifisch an den Primärantikörper banden, für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die sekundären Antikörper waren an eine Meerrettichperoxidase (HRP) gebunden, sodass nur an den Stellen, an denen der primäre Antikörper gebunden hatte, ein Biolumineszenzsignal entstand. Dieses Signal wurde über einen lichtsensitiven Film auf genommen. [295]

#### 4.5.4 Antikörper für Detektion der spezifischen Proteine auf den Membranen

Antigen	Spezies	Hersteller
β-Actin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA
eEF2	Ziege	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA
Glyoxalase I	Hase	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA
MAPKAPK2	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
p38 MAPK	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
p-p38 MAPK	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
PRDX1	Hase	Abcam plc, Cambridge Großbritannien

#### HRP gekoppelte Sekundärantikörper

Maus IgG	Esel	Dianova GmbH, Hamburg Deutschland
Ziege IgG	Esel	Dianova GmbH, Hamburg Deutschland
Hase IgG	Esel	Dianova GmbH, Hamburg Deutschland

### 4.6 Bestimmung der Anzahl der PRDX1 Allele in den Gliomzellen

Neben der Bestimmung der Genexpression von *PRDX1* auf mRNA- und Proteinebene wurde in dieser Arbeit die Anzahl der Allele des *PRDX1* Gens im Verhältnis zu einem monoallelischen Kontrollgen untersucht [277].

#### 4.6.1 qPCR basierter Nachweis der Anzahl von Allelen

Die genomische DNA wurde hierfür mit dem *Genomic DNA Clean & Concentrator Kit* (Zymo Research Corporation, Irvine USA) isoliert und gereinigt. Äquivalent zu der Bestimmung der mRNA Expression wurden 10 ng der DNA mit 1 pmol der Primerpaare in einem 10 µl Reaktionsansatz mit *SYBR-Green Master Mix* (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Basel Schweiz) über 45 Zyklen amplifiziert. Die im *SYBR Green Master Mix* enthaltene *HotStart* Polymerase benötigte einen initialen Aktivierungsschritt bei 95°C für 5 min. Dem anschlossen folgte die Amplifikationsphase. Diese setzte sich aus einem 45-fach wiederholten Zyklus aus Denaturierung (10s bei 95°C), Hybridisierung der *Primer* (10s bei 60°C) und Elongation (30s bei 72°C) zusammen. Um zu gewährleisten, dass die amplifizierten PCR Fragmente den gewünschten Amplikons entsprechen, wurde bei jeder qPCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, bei der die Temperatur schrittweise (1°C/s) von 65°C auf 97°C erhöht wurde. Als Referenzgen eignete sich das monoallelische Gen des Insulinähnlichen Wachstumsfaktors (IGF-1). Die Auswertung der in der qPCR generierten Daten wurde analog zur mRNA Analyse durchgeführt, wobei Insulinähnlicher Wachstumsfaktor 1 (*IGF*) als *Housekeeping*-Gen eingesetzt wurde und die *PRDX1* Introne als Proben.

#### 4.6.2 Primersysteme (5'→ 3'):

Die Anforderungen an die *Primer* für diese Form der qPCR variierten im Grunde nur in einem Punkt von den *Primern*, die für die Analyse der mRNA verwendet werden konnten. Hierbei war es wichtig, dass die *Primer* in jedem Falle in den Intronbereichen der jeweiligen Gene banden, um sicher zu stellen, dass ausschließlich die Genkopien amplifiziert wurden und nicht das Transkript.

IGF Intron	<i>Fwd:</i>	AGCTCGGCATAGTCTT	Effizienz	2.17
	<i>Rev:</i>	CCAAGTGAGGGGTGTGA		
PRDX1 Intron A	<i>Fwd:</i>	ACCTGGCAGAGAAGAAG	Effizienz	1.9
	<i>Rev:</i>	GCATTCCTCTTTCCCCTTTC		
PRDX1 Intron B	<i>Fwd:</i>	CCTGAACCCAGGCTTTCATA	Effizienz	1.85
	<i>Rev:</i>	GTTTGGCATTGCTTGGCTCT		

### 4.7 Migration von Gliomzellen

Die Motilität und Migration der Gliomzellen wurde in zwei verschiedenen Versuchsansätzen untersucht:

#### 4.7.1 Untersuchung der Motilität der Gliomzellen (*Scratch Assay*)

Mit Hilfe des *Scratch Assay* wurde ermittelt wie weit die Gliomzellen ein Spalt, der eine konfluente Zellschicht durchzieht, in einer bestimmten Zeit schließen konnten [296]. Hierzu wurden die entsprechenden Zellen über Nacht zu einer dichten Schicht in einer 96-*well* Platte adhären gelassen. Am nächsten Tag wurde ein Spalt mit Hilfe einer 200 µl Pipettenspitze jeweils mittig in der Vertiefung generiert. Abgelöste Zellen und Zellfragmente wurden durch das Wechseln des Mediums entfernt. Eventuell benötigte Zusätze wie Inhibitoren oder Aktivatoren wurden dem neuen Medium in entsprechender Konzentration zugesetzt. Zur Erfassung der Spaltbreite wurden mit dem Axio *Observer* Z1 Mikroskop (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) Aufnahmen direkt nach der Einführung des Spalts und nach achttündiger Inkubation aufgenommen. Der Abstand zwischen den Spaltgrenzen wurde mit der Fiji Software [297] ermittelt und die beiden Zeitpunkte in Relation zueinander gesetzt um die Spaltverkleinerung in Prozent angeben zu können. Zur Signifikanzanalyse wurde ein unabhängiger Zweistichproben-t-Test mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) durchgeführt (Signifikanzniveau  $p = 0.05$ ).

#### 4.7.2 *Boyden Chamber* Migrationsversuch

Als weiteren Migrationsversuch wurde ein *Boyden Chamber* Migrationsversuch durchgeführt, bei dem die Zellen gerichtet durch eine Membran gesteuert durch Chemokinen wandern mussten [298]. Es ist zwingend erforderlich, dass die Zellen über Nacht in Minimalmedium kultiviert wurden, sodass die Wachstumsfaktoren des Kultivierungsmediums als Chemoattraktant wirken konnten. Die Zellen wurden in Minimalmedium in der oberen Kammer ausgesät, sodass sie innerhalb der achttündigen Inkubationszeit auf die Unterseite der Membran migrieren konnten, die sich im Vollmedium befand. Je nach eingesetzter Zelllinie sind unterschiedliche Zellanzahlen eingesetzt worden – von den hochgradigen Linien Ln229 und Hs683 wurden 20 000 Zellen und von den niedergradigen NCH1681 und NCH612 40 000 Zellen pro Kammer ausgesät. Die Zellen, die sich nach der Inkubation noch auf der oberen Seite der Membran befanden, wurden entfernt und die migrierten Zellen mit 4% Paraformaldehyd (PFA) an der Membranunterseite fixiert. Für die Auswertung wurden die Zellkerne mit 0.1 µM

4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI) für 10 min bei Raumtemperatur angefärbt und mit dem Axio *Observer* Z1 Epifluoreszenzmikroskop (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) aufgenommen. Die Zellanzahl wurde nun pro aufgenommenen Bild bestimmt und anschließend mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) auf signifikante Unterschiede analysiert (Signifikanzniveau  $p = 0.05$ ).

### 4.8 Infiltration von Gliomzellen

Zur Analyse der Infiltration von Gliomzellen wurden folgende Methoden verwendet:

#### 4.8.1 *Boyden Chamber* Versuch

Der *Boyden Chamber* Versuch beruhte auf dem gleichen Prinzip wie die Untersuchung der Migration mit dem Unterschied, dass eine künstliche ECM in Form von Matrigel auf die Membran gegeben wurde [299]. Eine 20%ige Matrigelmischung wurde in die Kammern gegeben und bildete nach einer Polymerisationszeit von einer Stunde bei 37°C eine Schicht oberhalb der Membran aus. Im Gegensatz zu der Migrationsanalyse wurden für den Invasionsversuch 40 000 Ln229 Zellen pro Kammer ausgesät. Anschließend an die achtstündige Inkubation bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurde der Versuch äquivalent zu dem *Boyden Chamber* Migrationsversuch durchgeführt.

#### 4.8.2 Infiltrationsanalyse durch *Realtime Cell Analysis* (RTCA)

Die RTCA Messung der Zellinvasion wurde durch das RTCA DP System (ACEA Bioscience, Inc., San Diego USA) möglich gemacht. Hierbei diente die Unterseite der Membran durch welche die Zellen wanderten als Elektrode, an der sich der Widerstand durch die adhärierenden Zellen änderte. Dementsprechend verhielt sich der aus der Messung der Impedanz errechnete *Cell Index* Wert so, dass der Wert stieg je mehr Zellen an der Elektrode adhärten [300]. Die Invasionsanalyse mit dem RTCA DP System beruhte ebenfalls auf der künstlichen ECM Matrigel, welches hier ebenfalls als 20%ige Verdünnung eingesetzt wurde. Die 16-well Platte für das RTCA DP System beruhte auf dem gleichen Prinzip wie die *Boyden Chamber* Kammer: Der untere Teil wurde mit Kultivierungsmedium gefüllt und in der oberen Kammer wurde eine Schicht Matrigel eingebettet. Nach der Polymerisierung des Matrigels musste eine Referenzmessung durchgeführt werden, bevor die Zellen analog zu dem *Boyden Chamber* Versuch ausgesät werden konnten. Nachdem die Zellen in die Kammern gegeben wurden, wurde über 24 Stunden jede Stunde eine Messung

durchgeführt. Aus den ermittelten Werten errechnet das System den *Cell index*. Die Impedanz an den Elektroden vergrößert sich durch adhätierende Zellen, die sich auf der Elektrode absetzen. Der *Cell index* wird dabei durch die Differenz von dem Impedanzwert an einem bestimmten Zeitpunkt und des Kontrollimpedanzwertes ohne Zellen errechnet:

$$Cell\ index = Impedanz_{Zeitpunkt\ x} - Impedanz_{Zeitpunkt\ 0}$$

Je mehr Zellen sich auf der Elektrode absetzen, desto größer wird der Impedanzwert, sodass gilt: Je mehr Zellen, desto höher der *Cell index*.

### 4.9 Immunfluoreszenzfärbung von Gliomzellen

#### 4.9.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung [301]

Die intrazelluläre Lokalisation von Proteinen, wie PRDX1 und p38 MAPK, wurden mit Hilfe von einer indirekten Immunfluoreszenzfärbung analysiert. Die adhätent wachsenden Ln229 und Hs683 Gliomzellen wurden über Nacht auf Poly-L-Lysin (Sigma-Aldrich Co. LLC., St. Louis USA) beschichteten Deckgläsern kultiviert und anschließend mit 4% PFA fixiert. Die unspezifische Bindung der Antikörper wurde verhindert indem die Proben eine Stunde in einer 10%igen Pferdeserumlösung in 0.05% PBS-T bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Gleichzeitig wurden dabei die Zellmembran durch das im PBS-T enthaltene Tween-20 permeabelisiert, sodass die Antigene für die Antikörper besser erreichbar wurden. Die primären Antikörper wurden 1:500 mit einer 4%igen Pferdeserumlösung in 0.05% PBS-T verdünnt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach einigen Waschschritten mit PBS wurden die sekundären Antikörper 1:500 ebenfalls in einer 4%igen Pferdeserumlösung verdünnt und auf die Proben gegeben. Diese Antikörperlösung wurde lichtgeschützt für zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert, da die sekundären Antikörper an ein Fluorophor gebunden waren. Zuletzt wurden die Zellkerne mit einer 0.1 µM DAPI Lösung angefärbt und die Proben anschließend gründlich mit PBS gewaschen, um ungebundene Antikörper und DAPI zu entfernen und die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren. Die Deckgläser wurden mit Mowiol auf Objektträger aufgebracht und mit dem konfokalen LSM780 Laserfluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) aufgenommen.

#### 4.9.2 Färbung des Actin Zytoskeletts

Des Weiteren wurden die Actin Filamente der Zellen mit Phalloidin-488 angefärbt. Phalloidin ist das Toxin des Grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*), das



irreversibel an filamentöses Actin bindet [302]. Um die Actin Filamente mit Phalloidin sichtbar zu machen, wurde dieses an ein Fluorophor gekoppelt, das nach der Anregung mit 490 nm mit einer Wellenlänge von 525 nm fluoresziert. Hierzu wurden die Zellen wie für die Immunfluoreszenzfärbung auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Die mit 4% PFA fixierten Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers Phalloidin-488 (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA) in 0.05% PBS-T für 20 min angefärbt. Die Zellkerne wurden mit 0.1  $\mu$ M DAPI angefärbt und die Deckgläser wie oben beschrieben auf Objektträger aufgebracht. Die Phalloidinfärbung wurde zum einen mit dem Axio Observer Z1 Fluoreszenzmikroskop (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch) zur Zellmorphologiebestimmung aufgenommen und zum anderen mit dem konfokalen LSM780 Laserfluoreszenzmikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland), um die Actin Strukturen genauer analysieren zu können. Die Zellmorphologie konnte in zwei Klassen eingeteilt werden: Zellen mit abgerundeten oder Zellen mit gespreiteten Phänotyp. Dies bedeutet, dass alle Zellen die keine Zellfortsätze ausgebildet haben als rund galten und alle die Ausläufer aufweisen als gespreitet [223]. Die statistische Auswertung der Klassengröße wurde über einen unabhängigen Zweistichproben-t-Test (Signifikanzniveau  $p = 0.05$ ) mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) durchgeführt.

#### 4.9.3 Primärantikörper für die Immunfluoreszenz

Antigen	Spezie	Hersteller
MAPKAPK2	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
p38 MAPK	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
p-p38 MAPK	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
PRDX1	Hase	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers USA
Vinculin	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas USA

#### 4.9.4 Fluorophor gekoppelte Sekundärantikörper

Antigen	Spezie	Hersteller
Anti-Hase IgG 488	Ziege	Abcam plc, Cambridge Großbritannien
Anti-Hase IgG 594	Ziege	Abcam plc, Cambridge Großbritannien
Anti-Maus IgG 594	Esel	Abcam plc, Cambridge Großbritannien

### 4.10 Analyse des Actin Zytoskeletts und Fokaladhäsionen

#### 4.10.1 Untersuchung der Dynamik des Actin Zytoskeletts

Zur Analyse der Dynamik des Actin Zytoskeletts wurde filamentöses Actin mit *LifeAct-mCherry* (Addgene, Cambridge USA) markiert. *LifeAct* ist ein Lipid, das spezifisch an filamentöses Actin bindet und zur Visualisierung dieser an ein Fluorophor gekoppelt ist [303]. Die Zellen wurden auf *μ-Slide 8 Well ibiTreat* Zellkulturplatten (ibidi GmbH, Martinsried (München), Deutschland) ausgesät und über Nacht adhären gelassen. Am nächsten Tag wurde die Transfektionmischung aus dem *LifeAct-mCherry* Plasmid und Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) nach Herstellerangaben hergestellt und zu den Zellen gegeben, um diese transient mit *LifeAct-mCherry* zu transfizieren. Die Zellen wurden acht Stunden mit dem Transfektionsgemisch bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bevor das Medium durch neues ersetzt wurde. Nach einem Tag wurde *LifeAct-mCherry* exprimiert, sodass die Zellen mit dem *UltraVIEW VoX 3D Live Cell Imaging System* (PerkinElmer, Inc., Waltham USA) aufgenommen werden konnten. Hierbei wurden die Zellen alle 90 s über 20 min aufgenommen. Die Längenänderungen der Actin Filamente wurden über die Zeit mit Fiji analysiert und mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA) auf statistische Signifikanzen mit einem unabhängigen Zweistichproben-t-Test untersucht (Signifikanzniveau  $p = 0.05$ ). [203]

#### 4.10.2 Untersuchung der Dynamik der Fokaladhäsionen

Zusätzlich zu der Dynamik des Actin Zytoskeletts wurde die Dynamik der Fokaladhäsionen untersucht, welche sich aus Längenänderung sowie der Auf- und Abbau der Fokaladhäsionen zusammen setzte. Die Markierung der Fokaladhäsionen wurde ebenfalls über eine transiente Transfektion basierend auf Lipofectamine® 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham USA) erreicht. Hierzu wurde ein kommerzielles Plasmid verwendet, das die Sequenz für ein *mCherry* gebundenes Vinculin trug (Addgene, Cambridge USA). Die Zellen wurden in *μ-Slide 8 Well ibiTreat* Zellkulturplatten ausgesät und nach der Adhäsion über Nacht nach Herstellerangaben transfiziert. Die Zellen wurden acht Stunden mit Transfektionsgemisch bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch durch den Wechsel des Mediums entfernt. Am darauffolgenden Tag wurden die lebenden Zellen mit dem *Axio Observer Z1* Mikroskop (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) im Abstand von 10 min über eine Stunde aufgenommen. Die Auswertung wurde mit Fiji und die statistische Auswertung wurde mit GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla USA)

durchgeführt, dabei wurde ein unabhängiger Zweistichproben-t-Test mit einem Signifikanzniveau  $p = 0.05$  verwendet. Es wurden dabei verschiedene Faktoren der Fokaladhäsionsdynamik ausgewertet. Zum einen wurde die Längenänderung über die Zeit [304] und zum anderen die Dauer für Aufbau und Abbau der Fokaladhäsionen bestimmt [305, 306].

### 4.11 *In vivo* Untersuchungen

#### 4.11.1 Implantation von Hs683 Gliomzellen in NOD/SCID/γ Mäuse

Hs683 Zellen wurden in Kooperation mit Dr. Julia Bode (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) in immundefiziente NOD/SCID/γ Mäuse intrakraniell implantiert [307]. Die Hs683 Zellen exprimierten neben GFP entweder eine Kontroll shRNA oder eine shRNA gegen PRDX1. Nach der Implantation der Zellen wurden die Tiere einmal die Woche gewogen und eine Bildgebung mittels Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Der Versuch wurde nach 10 Monaten gestoppt. Nachdem die Tiere perfundiert wurden, wurde das Gehirn extrahiert und mit 4% PFA fixiert. Die fixierten Gehirne wurden mit TissueTek® O.C.T.™ Compound (Sakura Finetek Europe B.V. KvK, Alphen aan den Rijn Niederlande) eingefroren und mit dem Leica CM1950 Cryostaten (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch Deutschland) in 50 µm dicke serielle Scheiben geschnitten, die für eine längere Lagerung bei -20°C in ein Kryokonservierungsmedium (0.9 M Saccharose, 1 M PBS, 30% (v/v) Ethylenglycol und 0.25 M Polyvinylpyrrolidone) überführt wurden. Um die Zielproteine auf den Schnitten zu färben mussten diese mit PBS gereinigt werden.

#### 4.11.2 Immunhistochemische Färbung der Gehirnschnitte

Spezielle Antigene wie zum Beispiel PRDX1 oder Haupthistokompatibilitätskomplex 1 (MHC1) wurden mittels Antikörper basierter Färbung im Gewebe sichtbar gemacht. Hierzu wurden die Gehirnschnitte zunächst mit 10% Pferdeserum verdünnt in 0.05% PBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, sodass unspezifische Bindungsstellen blockiert wurden. Anschließend wurden die Schnitte mit den entsprechenden Antikörpern inkubiert, dabei wurden die Antikörper 1:500 in einer 3%igen Pferdeserumlösung in 0.05% PBS-T verdünnt. Die Proben wurden über Nacht bei 4°C mit den Primärantikörpern inkubiert und anschließend gründlich mit PBS gewaschen bevor der Sekundärantikörper zu den Schnitten gegeben werden konnte. Die Sekundärantikörper wurden 1:500 in 3% Pferdeserum in 0.05% PBS-T verdünnt

und die Schnitte darin zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Zellkerne mit 0.1  $\mu$ M DAPI gefärbt und die Schnitte auf Objektträger aufgebracht. Das Deckglas wurde mit Mowiol aufgebracht und zusätzlich mit Nagellack fixiert. Die Färbung wurde mit dem Laserkonfokalmikroskop LSM780 (Carl Zeiss AG, Oberkochen Deutschland) aufgenommen.

### 4.11.3 Antikörper für immunhistochemische Färbung von Gehirnschnitten

Antigen	Spezie	Hersteller
GFP	Huhn	Merck KGaA, Darmstadt Deutschland
MHC1	Hase	Wabko
PRDX1	Hase	Abcam plc, Cambridge Großbritannien

### 4.11.4 Fluorophore gekoppelte Sekundärantikörper für die Färbung von Gehirnschnitten

Anti-Hase IgG 488	Ziege	Abcam plc, Cambridge Großbritannien
Anti-Hase IgG 594	Ziege	Abcam plc, Cambridge Großbritannien
Anti-Huhn IgG 488	Ziege	Abcam plc, Cambridge Großbritannien
Anti-Maus IgG 594	Esel	Abcam plc, Cambridge Großbritannien

## 4.12 Isolation von Neuronen aus dem Cerebellum von Mäusen

Die cerebellaren Neurone wurden an Hand eines angepassten Protokolls basierend auf einer Studie von Smith T.H. und Kollegen durchgeführt [308]. Das Gehirn wurde aus fünf bis sieben Tagen alten Mäusen isoliert und von den Hirnhäuten befreit. Die Cerebella wurden in ein 15 ml Reagiergefäß überführt und mit 5 ml der ersten Lösung (1x Krebs Lösung, 0,0075 % (w/v) BSA, 0,05 M  $\text{MgSO}_4$ , pH 7,4) versetzt. Das Gewebe wurde mit Hilfe einer 5 ml Pipette manuell dissoziiert und anschließend bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und durch 5 ml der ersten Lösung mit zusätzlich 0.025% Trypsin ersetzt. Das Pellet wurde durch fünfmaliges auf- und ab Pipettieren mit einer 5 ml Pipette resuspendiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 37°C im Wasserbad inkubiert und gelegentlich geschüttelt. Währenddessen wurde die zweite Lösung (10 ml der ersten Lösung, 100  $\mu$ l DNase I, 100  $\mu$ l Trypsininhibitor und 100  $\mu$ l einer 1 M  $\text{MgSO}_4$  Lösung) und die dritte Lösung (10 ml der ersten Lösung, 12  $\mu$ l einer 100 mM  $\text{CaCl}_2$  Lösung und 83  $\mu$ l einer 1 M  $\text{MgSO}_4$  Lösung) vorbereitet. Nach der Inkubationszeit wurde die Trypsinreaktion durch die Zugabe einer Lösung bestehend aus 64% der ersten Lösung und 36% der zweiten Lösung im Verhältnis 1:1 zu dem bestehenden Volumen gestoppt. Die Suspension wurde bei 1500 rpm für 3 min zentrifugiert und Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in der zweiten Lösung aufgenommen. Die noch bestehenden Gewebeteile wurden durch das Pipettieren mit einer abgerundeten Pasteurpipette aus Glas dissoziiert. Anschließend wurde die

zweifache Menge der dritten Lösung hinzugegeben. Abschließend wurde die Suspension 5 min bei 1900 rpm zentrifugiert und der Überstand anschließend verworfen. Die Zellen wurden in 10 ml Kulturmedium (Neurobasalmedium, einfach konzentrierter B27 Zusatz, 2 mM Glutamine und 1% (v/v) P/S) aufgenommen und in einer Petrischale mit 10 cm Durchmesser ausgesät. Nach einer Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> hatten sich alle Zellenarten außer den Neuronen abgesetzt, diese wurden mit dem Medium abgenommen. Die Neuronen wurden durch die Zentrifugation bei 1900 rpm für 5 min pelletiert. Das Pellet wurde mit einer abgerundeten Pasteurpipette in Kulturmedium dissoziiert und die Zellen für die Versuche ausgesät.

### 4.13 Behandlung der Gliomzellen mit verschiedenen Substanzen

#### 4.13.1 TMZ

TMZ wurde in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt, entsprechend der Studie von L.Dittmann und Kollegen mit einer Konzentration von 400 µM TMZ für 5 Tage eingesetzt [101]. Zusätzlich wurde mit 100 µM eine niedrigere Konzentration von TMZ verwendet. Die organotypischen Gehirnschnitte wurden mit 400 µM TMZ behandelt.

#### 4.13.2 Anisomycin

Anisomycin wurde in einer Konzentration von 4 µM für 30 min eingesetzt [309]. Für die Analyse der Migration wurden 4 µM über die komplette Inkubationszeit verwendet.

#### 4.13.3 SB203580

SB203580 wurde für 60 min in einer Konzentration von 10 µM verwendet [309, 310]. Um die Migration der Gliomzellen zu untersuchen wurden die Zellen über den kompletten Inkubationszeitraum mit SB203580 behandelt. Die organotypischen Gehirnschnitte wurden mit 60 µM SB203580 behandelt.

#### 4.13.4 Ade

Ade wurde in einer Konzentration von 4 µM eingesetzt und über Nacht mit den Zellen inkubiert [311].

### 5. Ergebnisse

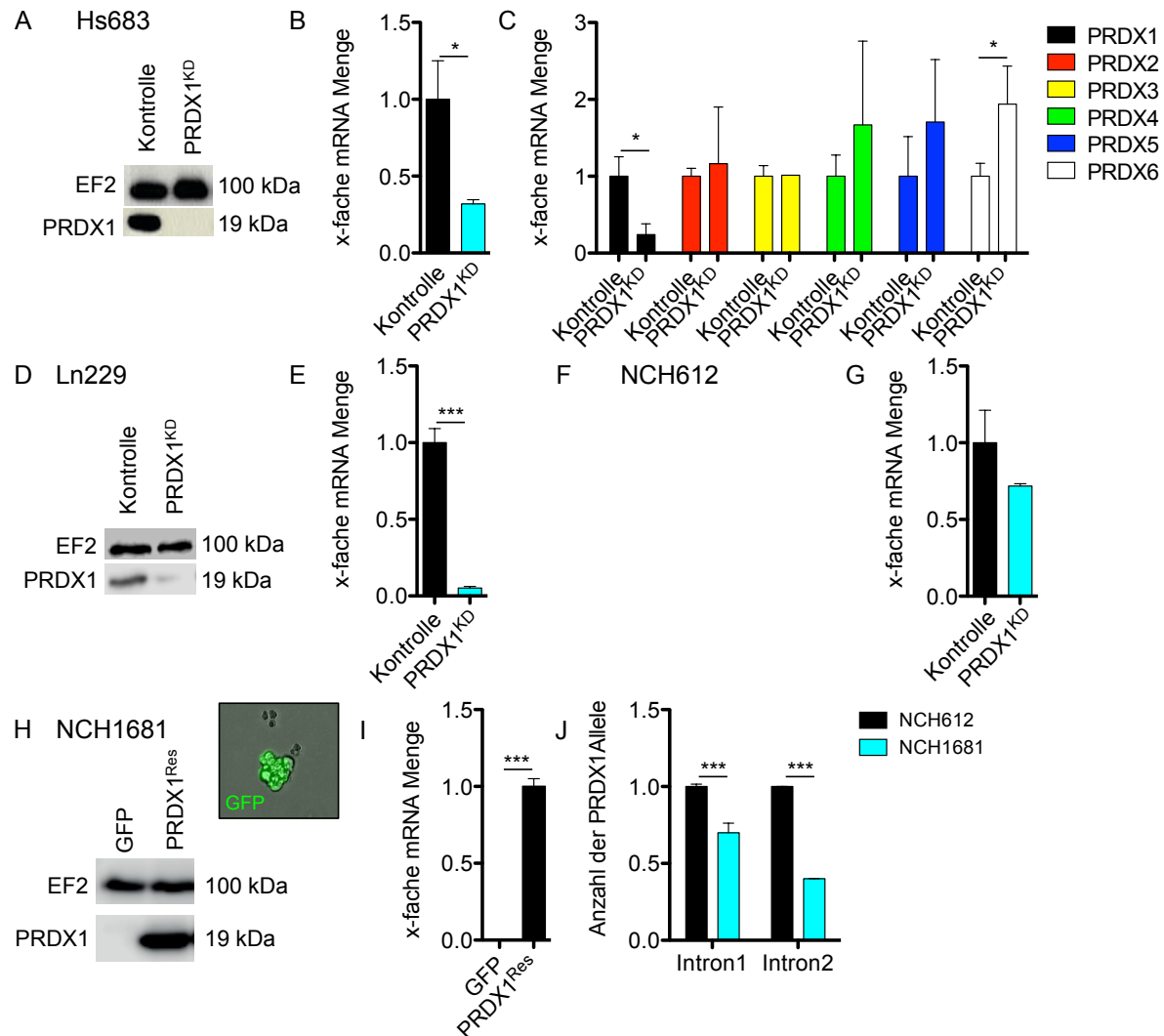
Im folgenden Kapitel wird an Hand der im Rahmen dieser Arbeit erzielten Ergebnisse der Einfluss von PRDX1 auf die Migration und Invasion von Gliomzellen erläutert.

#### 5.1 Charakterisierung der verwendeten Gliomzellen im Bezug auf PRDX1

In dieser Arbeit wurden die verwendeten Gliomzellen maßgeblich auf die Expression des *PRDX1* Gens charakterisiert, da dieses Gen durch seinen Lokus auf dem chromosomalen Arm 1p34.1 in den verschiedenen Gliomen häufig deletiert oder epigenetisch inaktiviert ist. Von den in dieser Arbeit verwendeten Zellen zeigte lediglich die NCH1681 Zelllinie eine reduzierte Expression von PRDX1 auf mRNA- und Proteinebene im Vergleich zu den anderen Linien (Abb. 4). Dies implizierte für die Untersuchung des Einflusses von PRDX1 auf die Migration und Invasion von Gliomzellen, dass zwei unterschiedlichen Vorgehensweisen angewendet werden mussten. In den PRDX1 exprimierenden Zellen musste die Expression von PRDX1 verringert werden, während in den NCH1681 Zellen die Expression von PRDX1 hergestellt werden musste. Hierzu wurden die jeweiligen DNA Sequenzen über ein auf replikationsinkompetenten Lentiviren basierendes Vektorsystem stabil in die DNA der Gliomzellen integriert. Die PRDX1 Expression wurde mittels einer über einen U6 Promotor transkribierten shRNA gegen die mRNA von *PRDX1* (TRCN0000029511) herunterreguliert (PRDX1<sup>KD</sup>). Als Kontrolle wurde eine shRNA verwendet, für die keine komplementäre Sequenz in den verwendeten Gliomzellen existiert. Die Reduktion von PRDX1 im Vergleich zu der Kontrolle war sowohl auf mRNA sowie auf Proteinebene zu beobachten (Abb. 4). Die Analyse der Transkriptmengen zeigte, dass die Reduktionen unterschiedlich stark waren. Bei den Hs683 Zellen wurde eine Reduktion von 60% im Vergleich zu den Kontrollzellen beobachtet (Abb. 4B), während die shRNA in den Ln229 Zellen eine fast vollständige Reduktion herbeiführte (Abb. 4E). In den NCH612 Zellen wurde mit einer Reduktion von 25% im Vergleich zu den Kontrollzellen die geringste Minderung der *PRDX1* mRNA Menge detektiert werden (Abb. 4G). Auf Proteinebene zeigten alle drei Zelllinien jedoch eine deutliche Reduktion des PRDX1 Proteins bei 19 kDa. Bei den Hs683 Zellen als auch den NCH612 Zellen war keine Bande für PRDX1 in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zu sehen, während die Ln229 Zellen eine minimale Restbande bei 19 kDa aufwiesen (Abb. 4A, D und F). Die Regulation der *PRDX1* Expression mittels stabil integrierter shRNA kann jedoch auch zu einer kompensatorischen Regulation der anderen PRDX Proteine führen, wobei an dieser Stelle dem über 90% homologen PRDX2 eine erhöhte Aufmerksamkeit geschenkt wurde. Die anderen *PRDX* Expressionen in Hs683 Zellen wurden auf Transkriptebeine analysiert. Die Verringerung der *PRDX1* Expression hatte keinen Effekt auf die Transkriptmengen von *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX4* und *PRDX5* (Abb. 4C). *PRDX6*, das einzige 1-Cys PRDX humaner Zellen, zeigte eine Erhöhung der mRNA Menge in Folge der

*PRDX1* Reduktion (Abb. 4C). In die NCH1681 Zellen wurde das *PRDX1* Gen unter der Regulation eines CMV Promotors eingebracht (*PRDX1*<sup>Res</sup>). Die Kontrolle für diese Zellen war die Expression des grün fluoreszierenden Proteins (*GFP*), die durch die grüne Fluoreszenz der Zellen bestätigt wurde (Abb. 4H). Die Transkription von *PRDX1* war erfolgreich und konnte durch den Anstieg der *PRDX1* mRNA mittels qPCR bestätigt werden (Abb. 4I). Ebenso zeigte sich auf Proteinebene, dass das *PRDX1* Protein nur in den *PRDX1*<sup>Res</sup> Zellen detektiert werden konnte (Abb. 4H).

Der endogene Verlust der Expression von *PRDX1* kann verschiedene Ursachen haben, wie zum Beispiel epigenetische Modifikationen oder der Teilverlust von Chromosomen. In dieser Arbeit wurde die Allelzahl des *PRDX1* Gens untersucht, um einen möglichen Verlust des *PRDX1* Genlokus festzustellen. Hierzu wurde eine qPCR durchgeführt, bei der die Allelzahl von *PRDX1* im Vergleich zu dem monoallelischen Gen *IGF1* bestimmt wurde. Diese Analyse zeigte, dass die NCH1681 Zellen nur ein Allel aufwiesen, während die ebenfalls niedergradigen NCH612 Gliomzellen, die allerdings *PRDX1* exprimieren, die doppelte Allelzahl hatten (Abb. 4J). Dies legt den Rückschluss nahe, dass NCH1681 Zellen mindestens den *PRDX1* Locus auf dem Chromosomenarm 1p verloren haben.

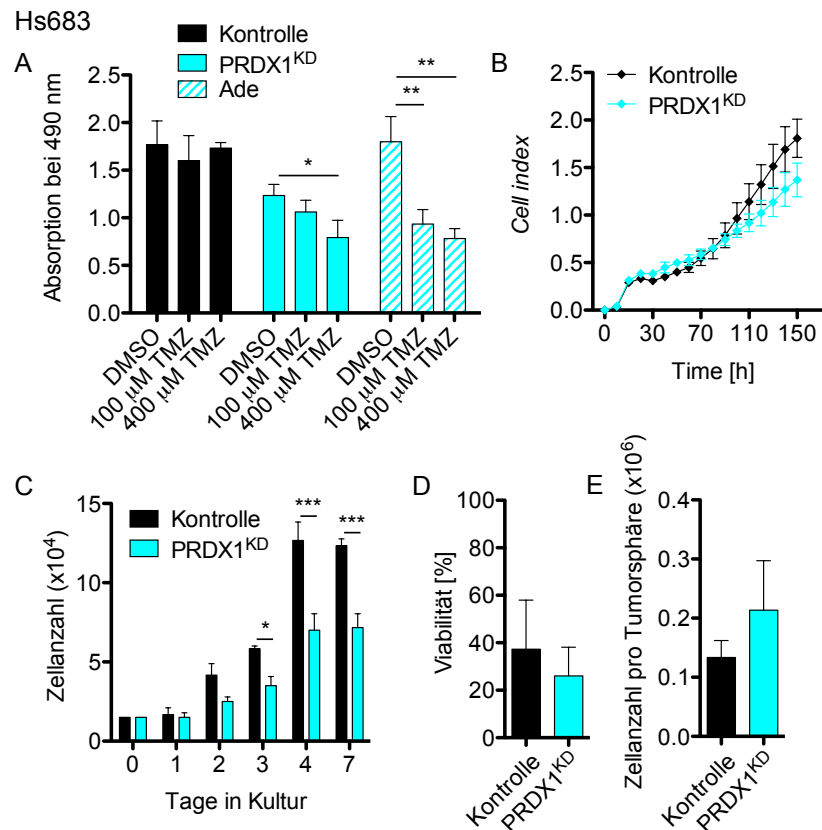


**Abb. 4 Modulation der PRDX1 Expression in den verwendeten Gliomzelllinien.** Die PRDX1 Expression wurde in PRDX1 exprimierenden Zellen durch das lentivirale Einbringen einer shRNA gegen die mRNA von *PRDX1* reduziert (PRDX1<sup>KD</sup>). (A,B) Die PRDX1 Expression wurde in den Hs683 herunter reguliert, dies zeigte die mRNA Untersuchung sowie die Analyse der Proteinmengen. Verglichen wurden die Kontrollzellen mit den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. (C) Expressionsanalyse der anderen *PRDX* Gene in Hs683 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen. Für die statistische Auswertung wurden jeweils die mRNA Mengen der verschiedenen *PRDX* Gene der Kontrollzellen mit den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen verglichen (D,E) Reduktion der PRDX1 Expression in Ln229 Gliomzellen auf mRNA und Proteinebene. Die Untersuchung der statistischen Zusammenhänge wurde ebenfalls zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen durchgeführt. (F,G) Reduktion von PRDX1 auf mRNA- und Proteinebene in niedergradigen NCH612 Gliomzellen. Die statistische Auswertung wurde zwischen PRDX1<sup>KD</sup> und Kontrollzellen durchgeführt. (H,I) Die niedergradigen NCH1681 Gliomzellen weisen keine endogene PRDX1 Expression auf, sodass die *PRDX1* Gensequenz eingebracht werden musste. Die Expression konnte sowohl auf mRNA und Proteinebene im Vergleich zu den Kontrollzellen nachgewiesen werden. Die statistischen Zusammenhänge wurden zwischen PRDX1<sup>Res</sup> und Kontrollzellen bestimmt. (J) Auf Grund der fehlenden PRDX1 Expression wurde die Anzahl der vorhandenen *PRDX1* Allele in den NCH612 und NCH1681 Zellen untersucht. Als Referenzgen wurde das monoallelische *IGF1* Gen verwendet. Die Analyse zeigte, dass die NCH1681 im Gegensatz zu den NCH612 nur halb so viel *PRDX1* Allele aufweist. Für die statistische Auswertung wurde jeweils ein zwei Stichproben-t-Test durchgeführt für dessen Signifikanzniveau gilt: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Die mRNA Menge wurde in Relation zu PGK bestimmt und auf die Kontrollzellen normiert. Hellblau entspricht immer der Kondition, die keine PRDX1 Expression aufweist; Schwarz der Kontrollkondition.



### **5.2 Der Verlust von PRDX1 beeinflusst die Proliferation und Viabilität von Gliomzellen negativ und erhöht die Sensitivität gegenüber TMZ**

In dieser Arbeit wurde zunächst die Reaktion der Gliomzellen auf die Behandlung mit TMZ untersucht, um den zuvor beschriebenen funktionellen Verlust von PRDX1 zu verifizieren [101] und auf den Effekt auf die Proliferation auszuweiten. Die Viabilität wurde mit dem *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* bestimmt. Dieser Test beruht auf der Nicotinamidadenindinukleotidphosphat (NADPH) bzw. Nicotinamidadenindinukleotid (NADH) abhängigen Umwandlung eines Tetrazoliumsals in farbiges Formazan, dessen Absorption bei 490 nm gemessen wird. Das für die Umwandlung benötigte NADPH/NADH wird in lebenden Zellen von Dehydrogenasen gebildet, sodass die Bildung von Formazan proportional zur Zellviabilität bzw. Zellanzahl ist. Die Hs683 Kontrollzellen zeigten keine Abnahme der Viabilität nach der Behandlung mit TMZ. Im Vergleich dazu zeigten die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen eine deutliche Abnahme der Viabilität einhergehend mit der Behandlung mit 400 µM TMZ (Abb. 5A). Dies bestätigt die Ergebnisse der Studie von L. Dittmann und Kollegen [101]. Zusätzlich wurden die Kontrollzellen mit einem PRDX1 Inhibitor – Adenanthin (Ade) – behandelt. Hierbei wurden entsprechend früherer Studien, die Ade verwendeten, 4 µM eingesetzt [311]. Die doppelte Behandlung der Kontrollzellen mit Ade und TMZ führte sowohl mit 100 µM als auch mit 400 µM TMZ zu einer signifikant reduzierten Viabilität (Abb. 5A). Des Weiteren wurde die Proliferationskapazität der Zellen adressiert. Der Impedanz basierte Proliferationsversuch mit dem RTCA DP System zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Hs683 Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 5B). Im Gegensatz dazu konnte jedoch ein Unterschied in der Zellanzahl durch Auszählen festgestellt werden. Hierbei nahm die Anzahl an Hs683 Kontrollzellen nach drei Tagen in der Kultur mehr zu als die der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 5C). Die Analyse der Proliferation der Hs683 Zellen in Tumorsphären wurde nach einer fünftägigen Inkubation als *hanging drop* durchgeführt. Hierbei wachsen die Zellen als dreidimensionale Kugelstruktur mit interzellulären Kontakten in einem Tropf aus Kultivierungsmedium. Quantifiziert wurde hierbei neben der Zellanzahl auch die Anzahl der viablen Zellen aus gleich vielen Tumorsphären. In dieser Kultivierungsform waren nach fünf Tagen mehr Zellen in der Probe mit reduzierten PRDX1 Proteinmengen, jedoch war dieser Unterschied nicht signifikant (Abb. 5D). Zudem zeigten die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen in der sphäroiden Wachstumsform eine leicht reduzierte Viabilität, wie es zuvor bei dem Impedanz basierten Versuch zu beobachten war. Dieser Unterschied stellt jedoch ebenfalls nur eine Tendenz und keine Signifikanz dar, sodass generell bei dem Wachstum als Tumorsphären kein Unterschied zwischen Kontrollzellen und den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen besteht (Abb. 5E).



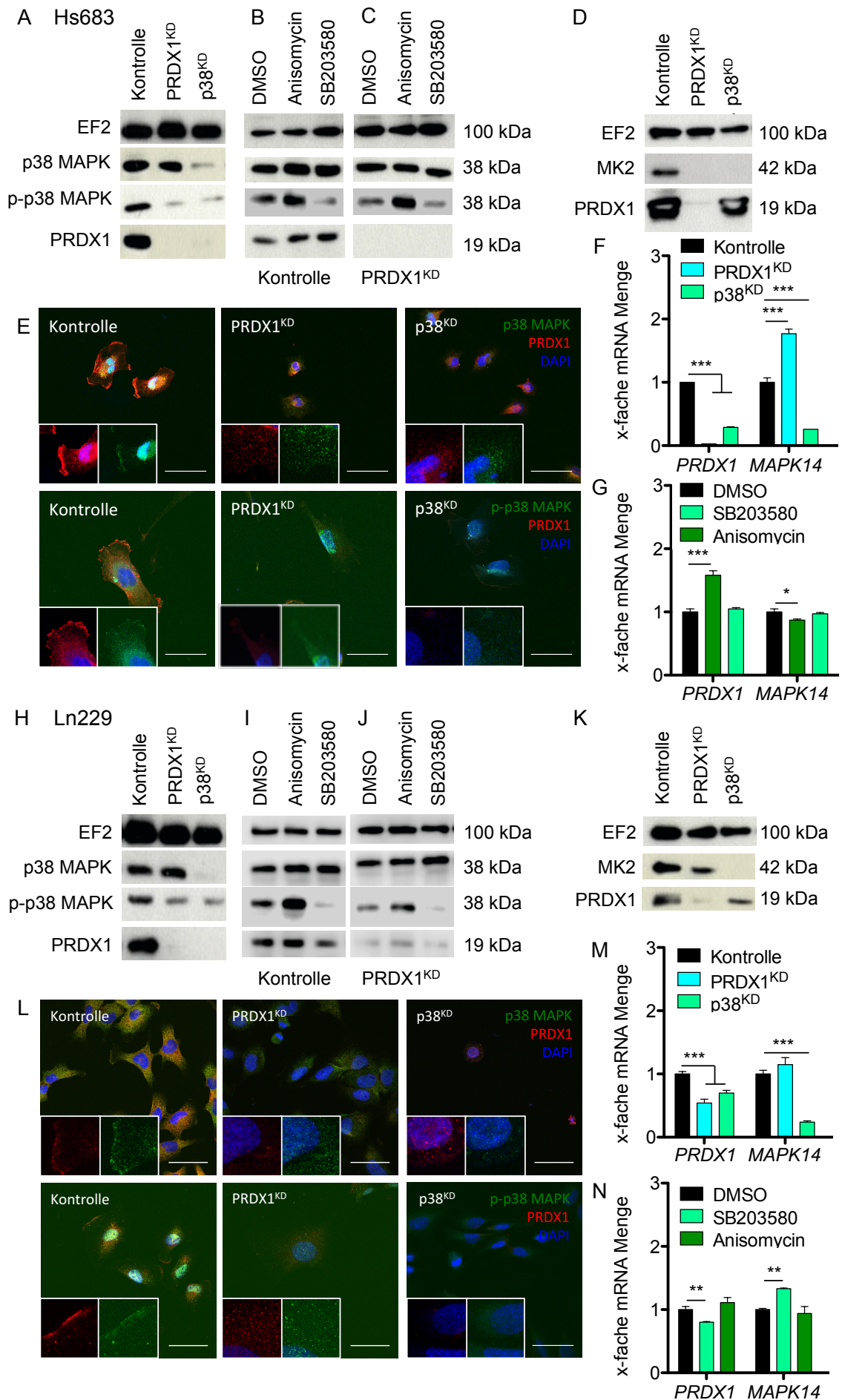
**Abb. 5 Der Verlust von PRDX1 führt zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber TMZ.** (A) Der Verlust von PRDX1 führt zu einer gesteigerten Sensibilität gegenüber TMZ in Hs683 Gliomzellen. Die Kontrollzellen zeigten nach der Behandlung mit TMZ keine Unterschiede in ihrer Viabilität, während die Viabilität der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen nach der Behandlung mit 400 μM TMZ deutlich reduziert war im Vergleich zu den DMSO behandelten PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Durch die Behandlung von Kontrollzellen mit Ade, einem Inhibitor von PRDX1, konnte die Sensitivität gegenüber TMZ deutlich erhöht werden, sodass bereits 100 μM TMZ die Viabilität signifikant reduzieren konnten. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt bei dem die behandelten Konditionen mit der jeweiligen Kontrolle verglichen wurden. (B) Mittels des RTCA DP Systems wurde die Proliferation anhand des Anstiegs der Impedanz untersucht, hierbei zeigte sich kein Unterschied in der Proliferation zwischen Hs683 Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Die statistische Auswertung beruhte auf einer zweifaktoriellen ANOVA bei der die zwei Konditionen PRDX1<sup>KD</sup> und Kontrollzellen über die Zeit mit einander verglichen wurden. Für das Signifikanzniveau gilt der gleiche Grundsatz wie für den zwei Stichproben-t-Test (siehe unten). (C) Die Analyse der Proliferation durch Quantifikation der Zellzahl zeigte, dass nach dem Verlust von PRDX1 die Zellanzahl weniger stark zunahm und sich von dem dritten Tag in Kultur an signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen abzeichneten. Hierbei wurden für die statistische Auswertung die zwei Konditionen an den einzelnen Zeitpunkten mittels zwei Stichproben-t-Test verglichen. (D,E) Das Wachstum der Hs683 Zellen als Sphäroide wies weder in der Anzahl von Zellen noch in der Viabilität Unterschiede zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen auf. Beide Untersuchungen wurden mittels zwei Stichproben-t-Test analysiert.

Die Signifikanzniveaus der statistischen Auswertungen richtete sich nach: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Hellblau entspricht immer der Kondition, die keine PRDX1 Expression aufweist; Schwarz der Kontrollkondition.

### 5.3. Die Aktivierung von p38 MAPK und dessen Signalweg wird in Gliomzellen durch PRDX1 beeinflusst

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass PRDX1 die Aktivierung der Proteinkinase p38 MAPK reguliert. Die Analyse der Proteine in Hs683 und Ln229 Gliomzellen zeigte für beide Zelllinien, dass der Verlust von PRDX1 mit der Reduktion von phosphoryliertem p38 MAPK (p-p38 MAPK) korreliert. Es war zu beobachten, dass in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen kein Unterschied in der p38 MAPK Proteinmenge bestand, jedoch wiesen diese Zellen eine deutliche Reduktion der Bande für p-p38 MAPK auf (Abb. 6A und H). Als Kontrolle für die Antikörperspezifität wurden zusätzlich Zellen mit einer Reduktion von p38 MAPK verwendet. Hierfür wurde die mRNA Menge von p38 MAPK mittels einer über Lentiviren eingebrachten shRNA gegen p38 MAPK mRNA reduziert (p38<sup>KD</sup>). In Folge dieser mRNA Reduktion war ein Verlust von p38 MAPK auf Proteinebene in beiden Zelllinien zu beobachten (Abb. 6A und H). Des Weiteren wurde die Expression von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK) auf mRNA Ebene nach der Reduktion des jeweilig anderen Transkripts untersucht. Dabei konnte eine Transkriptreduktion von *PRDX1* in den p38<sup>KD</sup> Zellen beider Zelllinien beobachtet werden (Abb. 6F und M, grüne Balken PRDX1). Der Verlust von PRDX1 zeigte lediglich in den Hs683 Zellen einen Effekt auf die Transkriptmenge von *MAPK14* (p38 MAPK), welche erhöht wurde (Abb. 6F blauer Balken p38 MAPK). Zusätzlich konnte ein Verlust von einem Effektorprotein von p38 MAPK beobachtet werden, dabei handelt es sich um eine weitere Proteinkinase MAPKAPK2 (MK2). Der Verlust von MK2 im Vergleich zu Kontrollzellen war auf Proteinebene in Hs683 und Ln229 Zellen sowohl in PRDX1<sup>KD</sup> sowie in p38<sup>KD</sup> Zellen zu beobachten (Abb. 6D und K). Zusätzlich wurde der Einfluss von PRDX1 auf p38 MAPK und deren intrazellulärer Lokalisation untersucht. Hierzu wurde in fixierten Hs683 oder Ln229 Zellen entweder PRDX1 und p38 MAPK oder PRDX1 und p-p38 MAPK über Immunfluoreszenzfärbung sichtbar gemacht. PRDX1 wurde durch einen Alexa-594 Fluorophor gekoppelten Antikörper angefärbt und p38 MAPK bzw. p-p38 MAPK mit einem Alexa-488 gekoppelten Antikörper. In den Kontrollzellen von Hs683 Zellen als auch Ln229 Zellen zeigte sich eine Anreicherung von PRDX1 an den Rändern der Zellfortsätze (Abb. 6E und L, erste Spalte, rot). Diese Lokalisation konnte ebenfalls für p38 MAPK und dessen aktivierte Form p-p38 MAPK beobachtet werden (Abb. 6E und L, erste Spalte, grün). Im Vergleich dazu konnte in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen eine Reduktion der Fluoreszenz bei 594 nm verzeichnet werden (Abb. 6E und L, zweite Spalte, rot). Der Verlust von PRDX1 hatte zur Folge, dass die Anreicherung von p38 MAPK in Zellfortsätzen vermindert wurde und zusätzlich die p-p38 MAPK Menge, wie schon in der Proteinanalyse gesehen, reduziert wurde (Abb. 6E und L, zweite Spalte, grün). Die Kontrolle mit p38<sup>KD</sup> Zellen zeigte, dass die Proteinmenge von p38 MAPK und p-p38 MAPK in beiden Zelllinien reduziert wurde (Abb. 6E und L, dritte Spalte, grün). Zusätzlich konnte in der Immunfluoreszenzfärbung durch die reduzierte rote Fluoreszenz

eine Reduktion von PRDX1 nach dem Verlust von p38 MAPK beobachtet werden (Abb. E und L, dritte Spalte, rot). Die Reduktion von PRDX1 auf Proteinebene wurde zuvor in der Proteinanalyse in sowohl Hs683 p38<sup>KD</sup> Zellen als auch in Ln229 p38<sup>KD</sup> Zellen beobachtet (Abb. 6A und H). Die Behandlung der Zellen mit einem p38 MAPK Aktivator (Anisomycin) [312] sowie dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 [310] konnten die Ergebnisse aus den Versuchen mit reduzierten Proteinmengen bestätigen. Die Aktivierung von p38 MAPK zeigte eine Erhöhung von phosphoryliertem p38 MAPK sowohl in den Kontrollzellen als auch in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen beider Zelllinien (Abb. 6B-C und I-J). Die Inhibition von p38 MAPK zeigte eine Reduktion von p-p38 MAPK in Kontrollzellen und zu einem geringeren Grad auch in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 6B-C und I-J). Die Analyse der Transkription von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK) nach der Behandlung mit entweder Anisomycin oder SB203580 zeigte in den Hs683 einen Effekt auf die Transkriptmengen beider Gene. Die Behandlung mit Anisomycin führte zu der Erhöhung der *PRDX1* mRNA Menge und gleichzeitig reduzierte sie die mRNA Menge von p38 MAPK leicht (Abb. 6G). In den Ln229 Zellen hatte die Behandlung mit Anisomycin keinen Effekt auf die Transkription der beiden Gene, jedoch hatte hier die Behandlung mit SB203580 Auswirkungen auf die mRNA Mengen von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK). Die Transkriptmengen von *PRDX1* wurden durch die Behandlung mit SB203580 reduziert, während die Transkription von *MAPK14* (p38 MAPK) erhöht wurde (Abb. 6N).

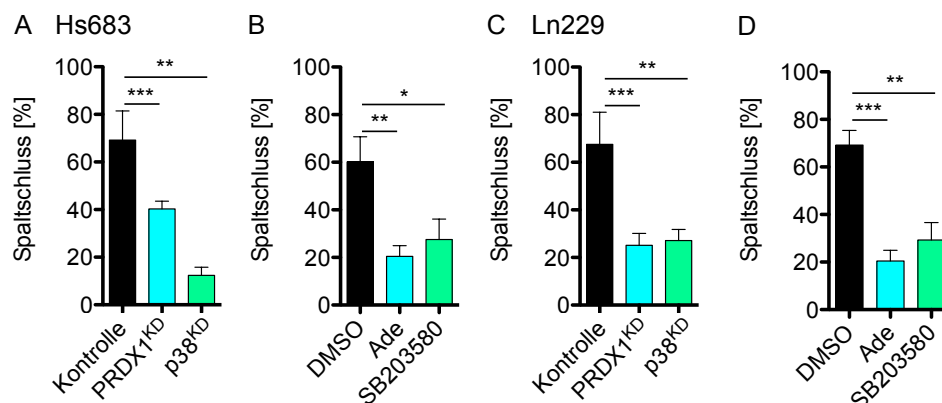


**Abb. 6 PRDX1 reguliert die Aktivierung von p38 MAPK in Gliomzellen.** (A) Die Proteinanalyse in den Hs683 Zellen zeigt, dass der Verlust von PRDX1 die Proteinmenge von p38 MAPK nicht beeinflusst. Allerdings reduziert der Verlust von PRDX1 die Menge an phosphoryliertem p38 MAPK (p-p38 MAPK). Die Reduktion von p38 MAPK führte zu der Reduktion von p-p38 MAPK aber auch von PRDX1 auf Proteinebene. EF2 wurde als Ladekontrolle verwendet. (B,C) Die Behandlung mit Anisomycin erhöhte die Menge an p-p38 MAPK ohne die p38 MAPK Menge zu beeinflussen in Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Die Behandlung mit SB203580 führt sowohl in den Kontrollzellen als auch in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zu der Reduktion von p-p38 MAPK. (D) MAPKAPK2 (MK2) ist ein Zielenzym von p38 MAPK. Die Reduktion von PRDX1KD führt zu einer leichten Reduktion der MK2 Proteinmenge, während der Verlust von p38 MAPK zu einem fast vollständigen Verschwinden von MK2 führt. (E) Die Immunfluoreszenzfärbung von PRDX1 und p38 MAPK bzw. dessen aktiver Form p-p38 MAPK zeigte deutlich, dass PRDX1 und p38 MAPK bzw. p-p38 MAPK vor allem in den Zellfortsätzen lokalisiert ist. Der Verlust von PRDX1 führt dazu, dass p38 MAPK nicht mehr in den Zellfortsätzen akkumuliert und p-p38 MAPK abnimmt. Maßstabsbalken 50 µm. (F,G) Analyse der Transkription von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK) nach dem Verlust von PRDX1 bzw. p38 MAPK (F) und nach der Behandlung mit Anisomycin oder SB203580 (G). Die mRNA Mengen wurden relativ zu den jeweiligen PGK mRNA Mengen angegeben und mit den Werten der Kontrollzellen normalisiert. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt und hatte folgende Signifikanzniveaus als Grundlage: \* entspricht p = 0.05, \*\* entsprechen p = 0.01 und \*\*\* entsprechen p = 0.001.

(H) Die Proteinanalyse in den Ln229 Zellen zeigt, dass der Verlust von PRDX1 die Proteinmenge von p38 MAPK nicht beeinflusst. Allerdings reduziert der Verlust von PRDX1 die Menge an phosphoryliertem p38 MAPK (p-p38 MAPK). Die Reduktion von p38 MAPK führte zu der Reduktion von p-p38 MAPK aber auch von PRDX1 auf Proteinebene. EF2 wurde als Ladekontrolle verwendet. (I,J) Die Behandlung mit Anisomycin erhöhte die Menge an p-p38 MAPK ohne die p38 MAPK Menge zu beeinflussen in Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Die Behandlung mit SB203580 führt sowohl in den Kontrollzellen als auch in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zu der Reduktion von p-p38 MAPK. (K) MAPKAPK2 (MK2) ist ein Zielenzym von p38 MAPK. Die Reduktion von PRDX1KD führt zu einer leichten Reduktion der MK2 Proteinmenge, während der Verlust von p38 MAPK zu einem fast vollständigen Verschwinden von MK2 führt. (L) Die Immunfluoreszenzfärbung von PRDX1 und p38 MAPK bzw. dessen aktiver Form p-p38 MAPK zeigte deutlich, dass PRDX1 und p38 MAPK bzw. p-p38 MAPK vor allem in den Zellfortsätzen lokalisiert ist. Der Verlust von PRDX1 führt dazu, dass p38 MAPK nicht mehr in den Zellfortsätzen akkumuliert und p-p38 MAPK abnimmt. Maßstabsbalken 50 µm. (M,N) Analyse der Transkription von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK) nach dem Verlust von PRDX1 bzw. p38 MAPK (M) und nach der Behandlung mit Anisomycin oder SB203580 (N). Die mRNA Mengen wurden relativ zu den jeweiligen PGK mRNA Mengen angegeben und mit den Werten der Kontrollzellen normalisiert. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt und hatte folgende Signifikanzniveaus als Grundlage: \* entspricht p = 0.05, \*\* entsprechen p = 0.01 und \*\*\* entsprechen p = 0.001.

#### 5.4 PRDX1 reguliert die Motilität von Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK

Die adhären wachsenden Gliomzellen Hs683 und Ln229 wurden für einen Motilitätsversuch verwendet – dem *Scratch Assay*. Hierzu wurden die Zellen als dichte Schicht ausgesät, welche durch das Einbringen eines Spaltes unterbrochen wurde. Zu Beginn und nach einer achtstündigen Inkubation wurde die Spaltgröße an der gleichen Stelle bestimmt. Aus beiden Größen wurde der Spaltschluss berechnet und als Prozentzahl angegeben. Hierbei zeigte sich, dass der Verlust von PRDX1 zu einer Reduktion des Spaltschlusses führt. Diese Verminderung des Spaltschlusses variierte für die zwei Zelllinien, sodass bei den Hs683 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen eine Reduktion um 25% (Abb. 7A) und bei den Ln229 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen um 40% (Abb. 7C) im Vergleich zu den Kontrollzellen zu beobachten war. Der Verlust von p38 MAPK führte in den Ln229 Zellen zu einer ähnlichen Reduktion wie der Verlust von PRDX1 (Abb. 7C). In den Hs683 Zellen konnte in den p38<sup>KD</sup> Zellen eine um 20% stärkere Reduktion des Spaltschlusses beobachtet werden im Vergleich zu den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen und um 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 7A). Die Ergebnisse der Proteinmengenreduktion wurde durch Verwendung von Inhibitoren überprüft. Hierbei zeigte sich, dass sowohl die Inhibition von PRDX1 mit Ade als auch von p38 MAPK mit SB203580 zu einem verringerten Spaltschluss führte. Die behandelten Hs683 Kontrollzellen zeigten eine Reduktion des Spaltschlusses um 40% für Ade und SB203580 (Abb. 7B). Die Behandlung mit Ade oder SB203580 führte in den Ln229 Kontrollzellen zu einer Reduktion des Spaltschlusses von 50% für Ade und 40% für SB203580 (Abb. 7D).



**Abb. 7 Der Verlust von PRDX1 reduziert die Motilität der Gliomzellen *in vitro*.** (A) Die Hs683 Gliomzellen zeigten eine verringerte Motilität in dem *in vitro Scratch Assay* nach dem Verlust von PRDX1 aber auch nach dem Verlust von p38 MAPK. (B) Die Behandlung mit sowohl Ade als auch SB203580 reduzierte den Spaltschluss in den Hs683 Zellen um je 40% verglichen mit den Kontrollzellen. (C) Der Verlust von PRDX1 aber auch von p38 MAPK führte in den Ln229 zu einer Reduktion des Spaltschlusses um 45%. (D) Die Behandlung mit Ade reduzierte den Spaltschluss der Ln229 Kontrollzellen um 50%, während die Behandlung mit SB203580 den Spaltschluss um 40% verringerte. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt und hatte folgende Signifikanzniveaus als Grundlage: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Verglichen wurden immer die Kontrollkonditionen mit den jeweiligen Proben wie zum Beispiel PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup>, Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust oder Inhibition von PRDX1; Grün – Verlust oder Inhibition von p38 MAPK

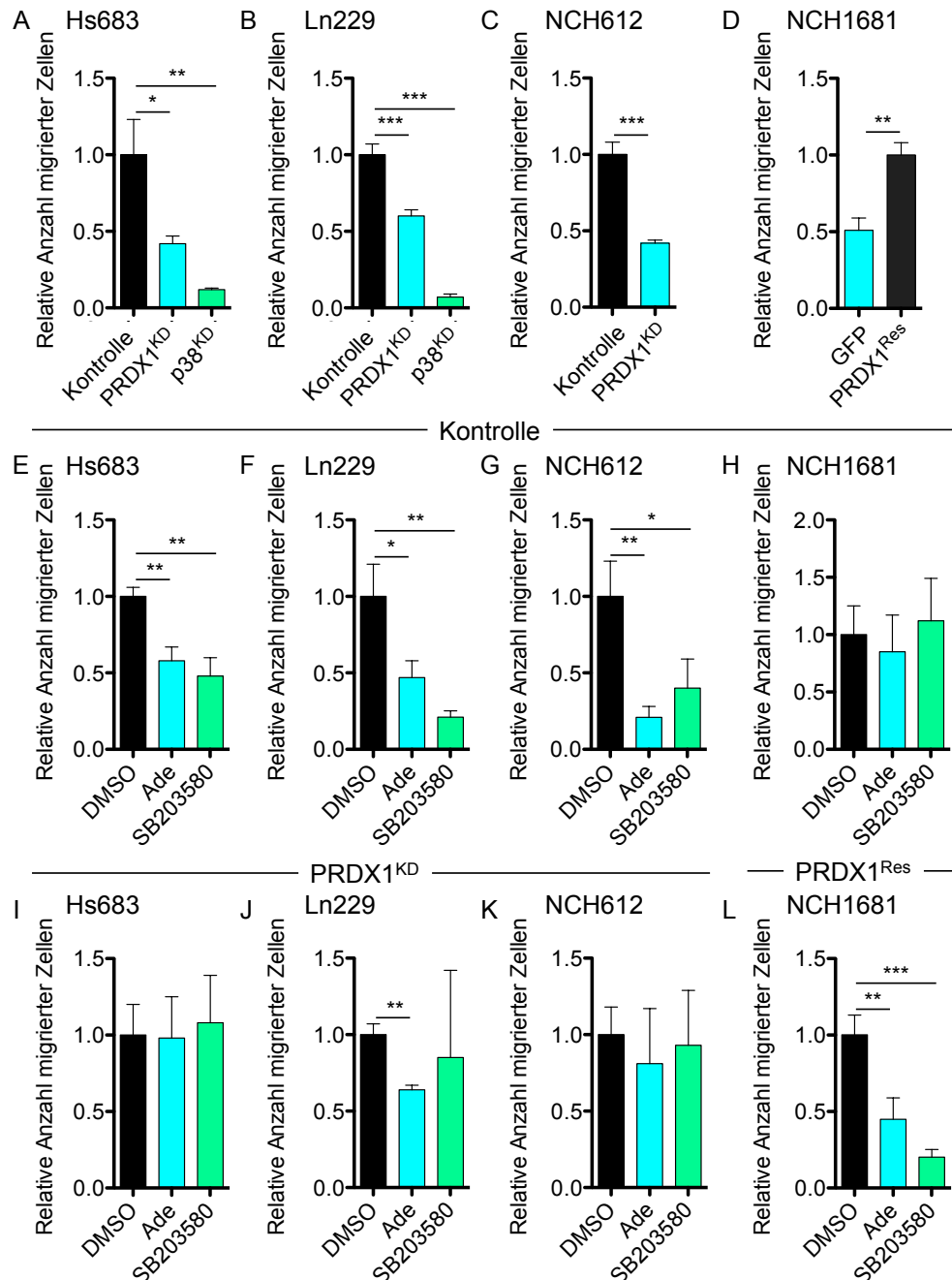
### 5.5 PRDX1 reguliert die Migration von Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK

In dieser Arbeit wurde neben der Motilität zusätzlich die Migration der Gliomzellen *in vitro* adressiert. Hierzu wurde ein *Boyden Chamber* Migrationsversuch durchgeführt, der auf dem Prinzip der durch Chemokine gerichteten Wanderung der Zellen basiert.

Zu nächst wurde der Einfluss von PRDX1 und p38 MAPK auf die Zellmigration untersucht, hierzu wurden Kontrollzellen mit PRDX1<sup>KD</sup> bzw. p38<sup>KD</sup> Zellen verglichen. Der Verlust von PRDX1 führte in den drei Zelllinien, die PRDX1 endogen exprimieren – Hs683 Zellen, Ln229 Zellen und NCH612 Zellen – zu einer signifikant verringerten Migration im *Boyden Chamber* Versuch. Der Verlust von PRDX1 führte in den Hs683 und den NCH612 Zellen zu einer Reduktion der Migration um die Hälfte im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 8A und C), während bei den Ln229 Zellen lediglich eine Reduktion um 25% beobachtet werden konnte (Abb. 8B). Der Verlust der Expression von p38 MAPK reduzierte die Anzahl migrierter Zellen sowohl in den Hs683 Zellen als auch in den Ln229 Zellen um 90% (Abb. 8A und B). Die Wiederherstellung der PRDX1 Expression in NCH1681 Zellen konnte den Effekt von PRDX1 auf die Migrationsfähigkeit der Zellen bestätigen. Hier zeigte sich, dass die doppelte Anzahl an Zellen die untere Seite der Membran erreichten, sobald PRDX1 exprimiert wurde (Abb. 8D). Zur Verifizierung der oben beschriebenen Ergebnisse wurden die Zellen entweder mit dem PRDX1 Inhibitor Ade oder dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 behandelt. Die Inhibition der beiden Proteine spiegelte die durch die reduzierte Expression erhaltenen Ergebnisse wieder. Sowohl die Hs683, die Ln229 als auch die NCH612 Kontrollzellen zeigten eine deutliche Reduktion der Anzahl migrierter Zellen bei einer Ade bzw. SB203580 Behandlung im Vergleich zu einer Behandlung mit DMSO. Die Reduktion der migrierten Zellen nach der Behandlung mit Ade war bei den Hs683 und den Ln229 Zellen durchschnittlich 50% (Abb. 8E und F), während in NCH612 Zellen eine Reduktion von 75% zu beobachten war (Abb. 8G). Die Behandlung mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 führte ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der migrierten Zellen. Die mit SB203580 behandelten Hs683 Zellen zeigten wie schon die Ade Behandlung eine Reduktion um 50% (Abb. 8E), während in den Ln229 Zellen eine Reduktion um durchschnittlich 75% beobachtet werden konnte (Abb. 8F). Die Behandlung mit SB203580 der NCH612 Zellen war weniger effektiv wie die Behandlung mit Ade und reduzierte die Migration um durchschnittlich 50% (Abb. 8G). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit entweder Ade oder SB203580 zeigte außer für die Ln229 Zellen keinen Unterschied in der Anzahl der gewanderten Zellen (Abb. 8I-K). Ln229 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, die mit Ade behandelt wurden, zeigten eine Verminderung der Migration im Vergleich zu DMSO behandelten PRDX1<sup>KD</sup> Zellen um 25% (Abb. 8J), während die Behandlung mit SB203580 keinen weiteren Effekt auf die Ln229 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen hatte. Die Verwendung der NCH1681 Linie, die keine endogene PRDX1 Expression hat, untermauerte den Effekt von PRDX1 auf die Migration von Gliomzellen. Diese Kontrollzellen,



die keine PRDX1 exprimieren, zeigten keinen Unterschied in der Anzahl der migrierten Zellen unabhängig ob sie mit DMSO, Ade oder SB203580 behandelt wurden (Abb. 8H). Ist jedoch die PRDX1 Expression wiederhergestellt, zeigte die Behandlung mit Ade und SB203580 eine signifikante Reduktion der Migration um 50% für Ade und 75% für SB203580 im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 8L).

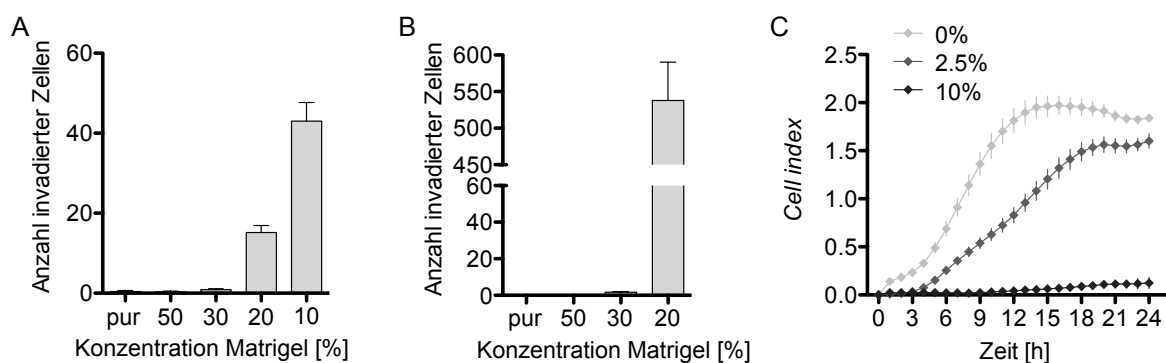


**Abb. 8 PRDX1 hat einen regulatorischen Effekt auf die Migration von Gliomzellen.** (A+B) Analyse der Migration von Hs683 (A) und Ln229 (B) Zellen im Hinblick auf die Reduktion der PRDX1 oder p38 MAPK Proteinmengen. (C+D) Analyse der Migration von NCH612 (C) und NCH1681 (D) Zellen in Abhängigkeit von der Expression von PRDX1. (E-H) Analyse der Migration der Kontrollzellen nach der Behandlung mit entweder Ade oder SB203580 im Vergleich zu DMSO. (I-K) Analyse der Migration der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen nach der Behandlung mit entweder Ade oder SB203580 im Vergleich mit einer Behandlung mit DMSO. (L) Analyse der Migration von PRDX1<sup>Res</sup> NCH1681 Zellen nach der Behandlung mit Ade oder SB203580. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt und hatte folgende Signifikanzniveaus als Grundlage: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\*

entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Verglichen wurden immer die Kontrollkonditionen mit den jeweiligen Proben wie zum Beispiel PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup>, Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust oder Inhibition von PRDX1; Grün – Verlust oder Inhibition von p38 MAPK

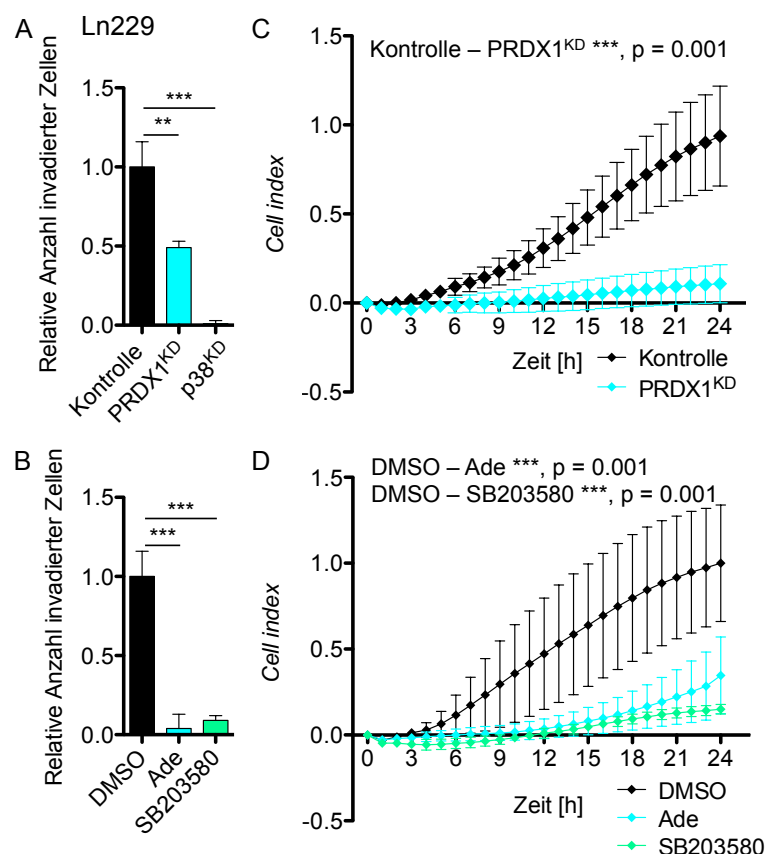
### 5.6 PRDX1 reguliert die Infiltration der Gliomzellen in drei dimensionale Matrices über die Aktivierung von p38 MAPK

*In vitro* wurde die Infiltration der Ln229 Gliomzellen mit einem Matrigel - basierten *Boyden Chamber* Versuch und mit dem auf dem gleichen Prinzip beruhenden Infiltrationsversuch mit dem RTCA DP System untersucht. Hierbei wurden nur die Ln229 Zellen verwendet, da nur diese fähig waren die 1:5 (20%) verdünnte Matrigelschicht zu durchwandern. Die Ln229 Zellen konnten nach einer acht stündigen Inkubation mit unterschiedlichen Matrigelkonzentrationen durch eine 1:5 (20%) Verdünnung wandern (Abb. 9A). Die Verlängerung der Inkubationszeit auf 24 Stunden zeigte ebenfalls, dass die Zellen erst ab einer Konzentration von 20% das Matrigel durchwandern konnten (Abb. 9B). Die Titration der idealen Matrigelkonzentration wurde für die Hs683 Zellen mit Hilfe des RTCA DP Systems durchgeführt. Hierbei war zu erkennen, dass die Zellen erst ab einer Matrigelkonzentration von 2.5% durch die Matrix wandern konnten (Abb. 9C). Die Signifikanzanalyse beruhte für die *Boyden Chamber* Versuche auf eine zwei Stichproben-t-Test, während für die Messung mit dem RTCA DP System eine zweifaktorielle ANOVA verwendet wurde. Dies entspräche einer Verdünnung von 1:40, bei der das Matrigel vornehmlich eine flüssige Konsistenz behält, sodass die matrigelbasierten Versuche nur mit den Ln229 Zellen durchgeführt wurden.



**Abb. 9 Titration der Matrigelkonzentration für Ln229 und Hs683 Zellen.** (A) Ln229 Zellen wurden für acht Stunden mit unterschiedlichen Matrigelkonzentrationen in einem *Boyden Chamber* Infiltrationsversuch inkubiert. (B) Ln229 Zellen wurden 24 Stunden mit unterschiedlichen Matrigelkonzentrationen in einem *Boyden Chamber* Infiltrationsversuch inkubiert. (C) Die Infiltration durch unterschiedliche Matrigelkonzentrationen wurde für die Hs683 Zellen über 24 Stunden mit Hilfe des RTCA DP Systems aufgezeichnet. Die statistische Auswertung wurde für den *Boyden Chamber* basierten Versuch mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, während für die Messung mit dem RTCA DP System eine zweifaktorielle ANOVA angewendet wurde. Die Signifikanzniveaus hatten als Grundlage: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Verglichen wurden die Matrigelverdünnungen zu den Kontrollen.

Der *Boyden Chamber* Versuch zeigte, dass in Folge der PRDX1 Reduktion die Anzahl der gewanderten Zellen im Vergleich zu den Kontrollzellen um durchschnittlich die Hälfte sinkt (Abb. 10A). Der Verlust von p38 MAPK führte zur fast völligen Verhinderung der Infiltration (Abb. 10A). Zur Verifizierung wurden wie schon zuvor die beiden Inhibitoren Ade und SB203580 verwendet. Diese zeigten ebenfalls eine Reduktion der gewanderten Zellen bis hin zum fast völligen Verlust der Migrationsfähigkeit (Abb. 10B). Die Messung mit dem RTCA DP System nimmt die Impedanzänderung über die Zeit auf. Die Impedanz an der Elektrode nimmt mit zunehmender Zellzahl zu und wird als *Cell index* angegeben. Auch hierbei zeigte sich, dass die Kontrollzellen wesentlich infiltrierender waren als die PRDX1<sup>KD</sup> (Abb. 10C). Dieser Effekt war ab der zehnten Stunde nach Versuchsbeginn signifikant. Die Behandlung mit Ade, einem PRDX1 Inhibitor, zeigte den gleichen Effekt (Abb. 10D). Des Weiteren wurde der Einfluss der p38 MAPK Inhibierung untersucht, hierzu wurden die Zellen mit SB203580 behandelt. Diese Behandlung zeigte ebenfalls eine Reduktion in der Infiltration, welche ab Stunde 9 nach Beginn signifikant war (Abb. 10D).



**Abb. 10 In vitro Infiltrationsanalyse der Ln229 Zellen im Hinblick auf PRDX1 und p38 MAPK.** (A) Der matrigelbasierte *Boyden Chamber* Infiltrationsversuch zeigte nach acht stündiger Inkubation, dass der Verlust von entweder PRDX1 oder p38 MAPK die Infiltration der Zellen hemmt. (B) Die Inhibition von entweder PRDX1 oder p38 MAPK führt ebenfalls zur Reduktion der Zellwanderung in einem matrigelbasierten *Boyden Chamber* Versuch. (C) Die Analyse der Wanderung durch eine Matrigel Matrix mit Hilfe des RTCA DP Systems zeigte ebenfalls, dass der Verlust von PRDX1 zu einer Reduktion der gewanderten Zellen führte. (D) Die Behandlung mit entweder Ade oder SB203580 reduzierte die Infiltration in der Impedanzbasierten Messung ebenfalls. Die statistische Auswertung wurde für den *Boyden Chamber* basierten Versuch mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, während für die Messung mit dem RTCA DP System eine zweifaktorielle ANOVA angewendet wurde.

Die Signifikanzniveaus hatten als Grundlage: \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$ . Verglichen wurden immer die Kontrollen mit den jeweiligen Proben, wie PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup>, Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust oder Inhibition von PRDX1; Grün – Verlust oder Inhibition von p38 MAPK

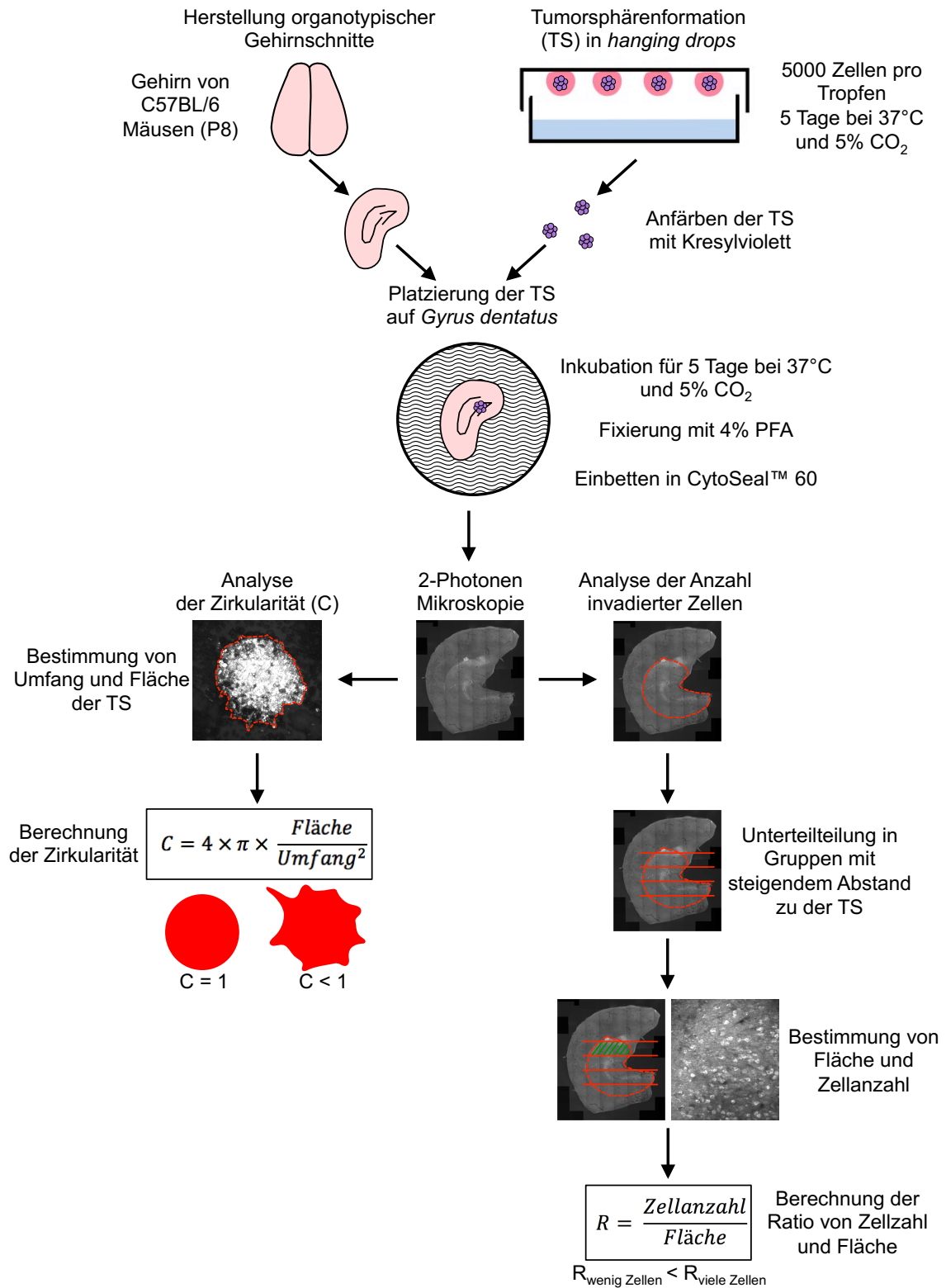
Zusätzlich zu den *in vitro* basierten Versuchen wurde die Infiltration durch die Verwendung organotypischer Gehirnschnittkulturen *ex vivo* untersucht. Diese haben den Vorteil, dass sie die natürliche extrazelluläre Matrix der Gliomzellen widerspiegeln, wie zum Beispiel Myelin, Blutgefäße und Immunzellen. Die Infiltration von Gliomzellen wurde auf organotypischen Schnitten des Hippocampus untersucht, das Protokoll hierzu wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert. Das folgende Protokoll ist in Abbildung 11 veranschaulicht.

Zur Herstellung der organotypischen Schnitte des Hippocampus wurden die extrahierten Gehirne von C57BL/6 Mäusen im Alter zwischen acht und elf Tagen mit einem Vibratom (Leica VT100 S) in 300  $\mu\text{m}$  dicke Scheiben geschnitten. Während des Schneides befanden sich die Hirne in einem isotonischen Medium, bestehend aus Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) und 0.85 M HEPES, sodass die Zellen der Gehirne nicht durch Austrocknung oder osmotisches Ungleichgewicht beschädigt wurden. Anschließend wurden die Schnitte an der Grenzphase zwischen Medium und Luft auf einer Filtermembran mit 0.4  $\mu\text{m}$  großen Poren (Falcon) kultiviert. Das Kultivierungsmedium setzte sich aus 50% (v/v) Minimal Essential Medium (MEM), 18% (v/v) EBSS, 1% (v/v) P/S, 5% (v/v) EBSS mit D-Glukose, 25% (v/v) Pferdeserum und 0.06% (v/v) Nysatin zusammen [313]. Nach einer Stunde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> wurden die Tumorsphären auf die Schnitte in der Region des *Gyrus dentatus* gesetzt [314]. Die Tumorsphären wurden zuvor über fünf Tage mittels der *hanging drop* Methode hergestellt [315]. Hierzu wurden GFP exprimierende Tumorzellen in Tropfen an der Unterseite von Petrischalendeckeln kultiviert. Um nach fünf Tagen entsprechend große Sphären zu erhalten, wurden pro Tropfen 5000 Zellen ausgesät. Die bereits als Sphären wachsenden niedergradigen Gliomzellen konnten direkt verwendet werden. Wenige Stunden vor der Fusion der Tumorsphären mit den Gehirnschnitten wurde zu den Tropfen bzw. zu dem Medium der Suspensionskulturen 0.001% Kresylviolett gegeben, sodass die Sphären sich von dem Schnitt optisch abheben und die genaue Lokalisation bestimmt werden konnte. Bis auf die Schnitte mit Ln229 Zellen betrug die Inkubationszeit aller Zellen fünf Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub>. Die Ln229 Zellen zeigten bei den voran gegangenen Versuchen eine wesentlich höhere Migration und Invasion, sodass hier eine verkürzte Inkubationszeit von einem Tag Anwendung fand. Im Anschluss an die Inkubation mit den Tumorzellen wurden die Schnitte in 4% PFA über Nacht fixiert und nach einem Waschschrift mit PBS in CytoSeal™ 60 (Thermo Scientific) eingebettet. Die fertigen Schnitte wurden in Kooperation mit Dr. Nikolas Dross (Nikon Imaging Center der Universität Heidelberg) mittels 2-Photonen Mikroskopie aufgenommen und über Fiji 2.0.0-rc-14/1.49g ([www.fiji.sc/Fiji](http://www.fiji.sc/Fiji)) ausgewertet [297]. Es zeigten sich zwei verschiedene Auswertungsmethoden als ideal zur Analyse des

generellen Infiltrationspotentials und der Langzeitinfiltration. Zunächst wurde die Zirkularität der Tumorsphären als generelles Maß der Infiltration bestimmt, indem die Grenzen der Sphäre markiert- und die Fläche sowie der Umfang bestimmt wurden [316]. Aus diesen Werten konnte die Zirkularität (C) unter Anwendung folgender Formel berechnet werden:

$$C = 4 \times \pi \times \frac{\text{Fläche}}{\text{Umfang}^2}$$

Diese Auswertung beruhte auf der Annahme, dass aus gleichmäßigeren Tumorsphären weniger Zellen abwandern, sodass eine runde Sphäre mit wenig Infiltration gleich zu setzen ist [314]. Je näher also der Wert der Zirkularität an eins herankommt, desto runder ist die Tumorsphäre. Zusätzlich wurde die Infiltration über einen Zeitraum von fünf Tagen bzw. für die Ln229 von einem Tag durch die Anzahl der infiltrierten Zellen an verschiedenen Entfernungen zur Tumorsphäre ermittelt. Die Ln229 Zellen zeigten bereits *in vitro* eine erhöhte Motilität, sodass eine kürzere Inkubationszeit bei den *ex vivo* Versuchen angewendet wird. Für die Analyse der Migration in den Hippocampus, wird dieser in verschiedene Gruppen unterteilt, die eine bestimmte Entfernung zu der Tumorsphäre haben. Anschließend wurden unter Verwendung der Fiji Software die Fläche der Gruppen und die darin enthaltenen Tumorzellen bestimmt. Um eine Vergleichbarkeit zwischen den Gruppen und den unterschiedlichen Schnitten zu erhalten, wurde eine Ratio von Zellanzahl und entsprechender Fläche berechnet. Dementsprechend erhält eine Gruppe mit mehr Zellen pro Fläche einen größeren Wert als eine gleichgroße Fläche mit weniger infiltrierten Zellen. Die Ergebnisse der Quantifizierungen für die zwei Analysemethoden und verschiedenen Konditionen werden im folgenden Absatz beschrieben.

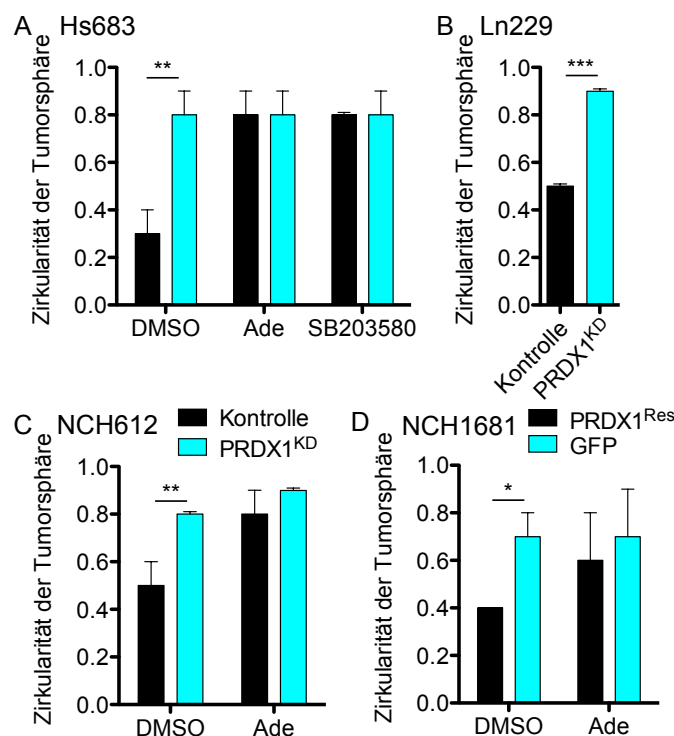


**Abb. 11 Protokoll für die Untersuchung der Gliomzellinfiltration der organotypischen Schnitte des Hippocampus.** Diese Abbildung veranschaulicht das Protokoll, das etabliert wurde, um die Infiltration von Gliomzellen in ihrer natürlichen Matrix zu untersuchen. TS - Tumorsphäre

Die Analyse der Zirkularität zeigte für Hs683 Zellen deutlich rundere Tumorsphären nach der Reduktion von PRDX1 (Abb. 12A). Der Verlust von PRDX1 führte zu einer Zunahme der Zirkularität von 0.3 (Kontrollzellen) auf 0.8 für die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Die Behandlung mit Ade sowie SB203580 erhöhte die Zirkularität der Tumorsphären der Kontrollzellen auf das Niveau der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 12A). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade und SB203580 hatte keinen weiteren Einfluss auf die Zirkularität der Tumorsphären, sodass für alle Konditionen außer den Kontrollzellen ein durchschnittlicher Wert von 0.8 ermittelt wurde (Abb. 12A). Bei den Ln229 Zellen wurde lediglich der Unterschied zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen untersucht. Die Kontrollzellen hatten einen Zirkularitätswert von 0.5, während die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen einen Wert von 0.9 aufwiesen und so auch hier der Effekt von PRDX1 bestätigt werden konnte (Abb. 12B). Die WHO Grad III Gliomzellen NCH1681 und NCH612 wuchsen bereits als Sphären, sodass diese direkt auf die Gehirnschnitte gegeben wurden. Der Vergleich zwischen PRDX1 exprimierenden Zellen und nicht PRDX1 - exprimierenden Zellen zeigte, dass auch in niedergradigen Zellen der Verlust von PRDX1 zur Erhöhung der Zirkularität führt. Die NCH612 Zellen hatten in der Kontrolle einen Wert von 0.5 für die Zirkularität. Der Wert der Zirkularität wurde durch den Verlust von PRDX1 auf 0.8 erhöht (Abb. 12C). Die Behandlung mit Ade erhöhte die Zirkularität der Tumorsphären der Kontrollzellen auf 0.8, während die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen nur einen minimalen und nicht signifikanten Anstieg auf 0.9 verzeichneten (Abb. 12C). In den NCH1681 Zellen wurde die PRDX1 Expression wiederhergestellt und GFP als Kontrolle verwendet. Die GFP exprimierenden Zellen wiesen eine Zirkularität von durchschnittlich 0.7 auf, während die eingebrachte PRDX1 Expression die Zirkularität signifikant auf 0.4 absenkte (Abb. 12D). Die Behandlung mit Ade hatte keinen Effekt auf die GFP exprimierenden Kontrollzellen, jedoch erhöhte sich der Wert für die Zirkularität in PRDX1<sup>Res</sup> Zellen auf 0.6 (Abb. 12D).

Des Weiteren wurde die Migration von Gliomzellen in das Gehirngewebe über einen Zeitraum von 5 Tagen mit Hilfe der Anzahl an infiltrierten Zellen im Schnitt analysiert. Hierzu wurde wie oben beschrieben die Ratio aus der Anzahl infiltrierter Zellen und der quantifizierten Fläche bestimmt und verglichen. Die Hs683 Zellen (Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen) wurden in diesem Versuch mit Ade und SB203580 behandelt, während die anderen Zellen nur mit Ade behandelt wurden. Im Vergleich zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigte sich in diesen Zellen, dass deutlich weniger Zellen aus den Sphären abwanderten. Die Anzahl an Kontrollzellen stieg mit steigender Entfernung zu der Tumorsphäre an, während bei den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen weniger Zellen durch den Schnitt wanderten. Dies resultierte in signifikanten Reduktionen der Ratio für PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen bei einer Entfernung von 1-2 mm und 3-4 mm (Abb. 13A). Zusätzlich wurden die Zellen mit Ade oder SB203580 behandelt. Hierbei konnte keine signifikante Veränderung der Infiltration bei den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen festgestellt werden (Abb.

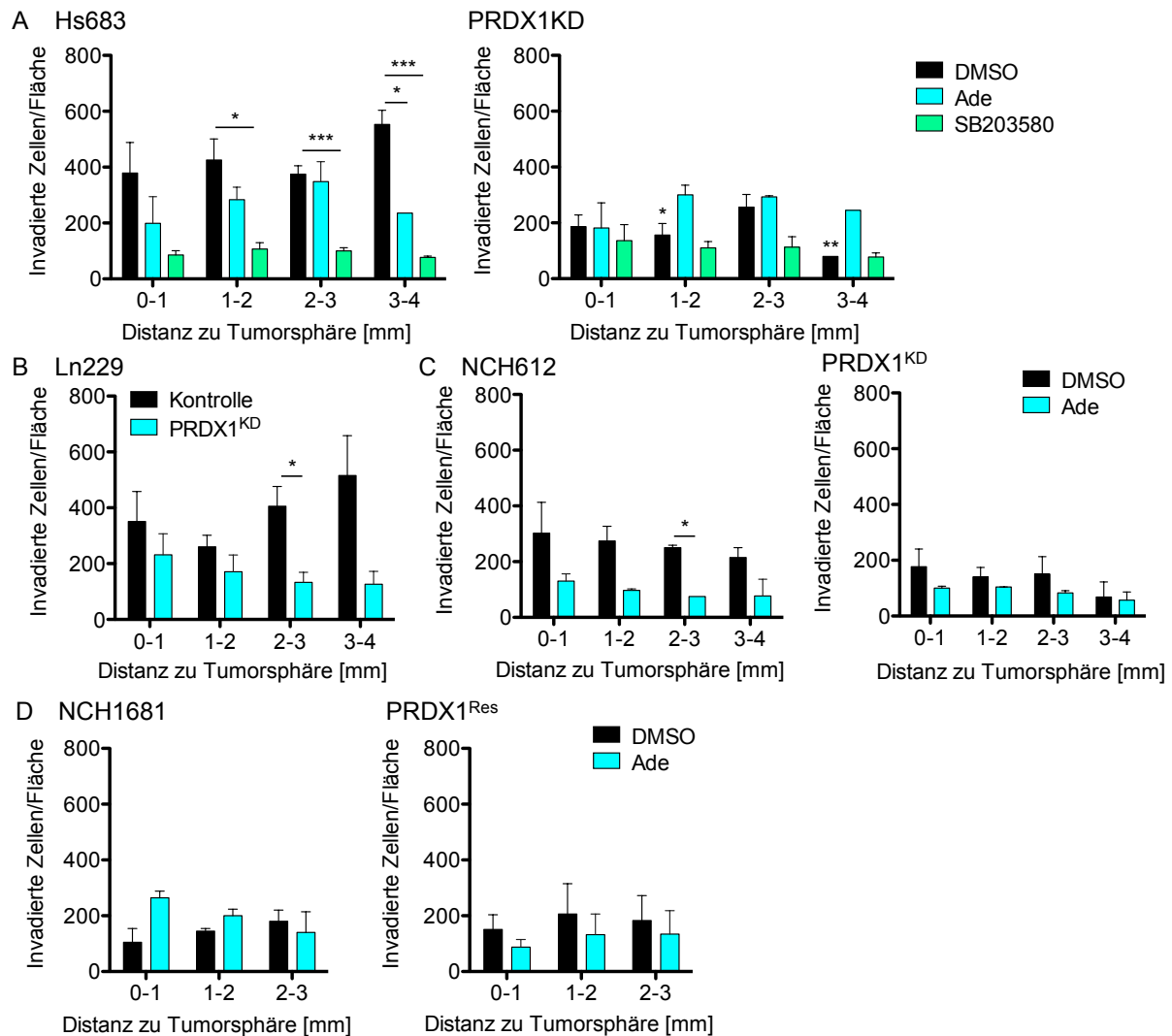
13A). Jedoch zeigte die Behandlung der Kontrollzellen mit Ade eine deutliche Reduktion der Infiltration bei der Entfernung von 3-4 mm (Abb. 13A). Die Behandlung mit SB203580 führte zu einer deutlichen Reduktion der Ratio in den behandelten Zellen verglichen mit den Kontrollzellen an den Entfernungen 1-2 mm, 2-3 mm und 3-4 mm (Abb. 13A). Bei den Ln229 Zellen wurden wie schon bei der Zirkularitätsanalyse lediglich die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen und die Kontrollzellen analysiert. Hierbei zeichnete sich die gleiche Tendenz wie schon bei den Hs683 Zellen ab (Abb. 13B). Die Kontrollzellen zeigten einen Anstieg der Zellzahl desto weiter sie von der Tumorsphäre entfernt waren. Im Kontrast dazu war bei den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen ein Abfall der Anzahl von infiltrieren Zellen mit steigender Entfernung zur Tumorsphäre zu beobachten. Jedoch konnte lediglich bei einer Entfernung von 2-3 mm eine Signifikanz mittels unabhängigem zwei Stichproben-t-Test gezeigt werden. Bei den niedergradigeren Gliomlinien wurde zusätzlich zum Vergleich zwischen PRDX1 exprimierenden und nicht exprimierenden Zellen die Behandlung mit Ade analysiert. Die Behandlung von NCH612 Kontrollzellen mit Ade zeigte eine reduzierte Wanderung in das umliegende Gehirngewebe im Vergleich zu den Kontrollzellen. Diese Reduktion war jedoch nur bei einer Entfernung von 2-3 mm signifikant (Abb.13C). Die Behandlung der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade hatte keinen Effekt auf die Infiltration der Zellen (Abb. 13C). Der Vergleich von Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigte ebenfalls eine Verminderte Infiltration in den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, die jedoch bei keiner Entfernung signifikant war. Die NCH1681 Zellen zeigten unabhängig von der Behandlung mit Ade keine Unterschiede zwischen GFP Kontrollzellen und PRDX1<sup>Res</sup> Zellen (Abb. 13D).



**Abb. 12 Analyse der Zirkularität der Tumorsphären.** (A) Der Verlust von PRDX1 in den Hs683 Zellen führte zu einer höheren Zirkularität, ebenso wie die Behandlung mit Ade und SB203580 (B) Der

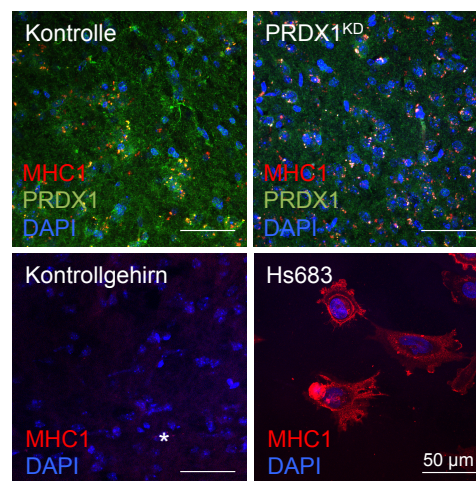


Verlust von PRDX1 führte dazu, dass Sphären aus Ln229 Zellen wesentlich runder waren als die aus Kontrollzellen bestehenden Sphären. (C) Der Verlust von PRDX1 in den NCH612 Zellen erhöhte die Zirkularität, ebenso wie die Behandlung mit Ade. (D) Das Wiedereinbringen der PRDX1 Expression in die NCH1681 Zellen führte zu einer reduzierten Zirkularität, die durch die Behandlung mit Ade wieder erhöht werden konnte. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte. Schwarz – PRDX1 exprimierend; Blau – fehlende PRDX1 Expression



**Abb. 13 Langzeitanalyse der Gliomzellwanderung in die organotypischen Schnitten des Hippocampus.** (A) Das linke Diagramm zeigt die Ration der Zellanzahl über die Fläche der Hs683 Kontrollzellen, während das rechte die Ration der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigt. Die eingezeichneten Signifikanzen der PRDX1<sup>KD</sup> DMSO behandelten Zellen referieren zu den DMSO behandelten Kontrollzellen. Schwarz – DMSO; Blau – PRDX1 Inhibition; Grün – p38 MAPK Inhibition (B) Vergleich der Invasion zwischen Ln229 Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Schwarz – Kontrolle; Blau – PRDX1<sup>KD</sup> (C) Vergleich der Infiltration von NCH612 Kontrollzellen (links) und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (rechts). Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte. Schwarz – DMSO, Blau – PRDX1 Inhibition (D) Vergleich der Infiltration von NCH1681 Kontrollzellen (links) und PRDX1<sup>Res</sup> Zellen (rechts), Schwarz – DMSO; Blau – PRDX1 Inhibition

Desweiteren wurde in einem Mausmodell die Rolle von PRDX1 in Gliomen untersucht. Hierzu wurden die Hs683 Gliomzellen analog zu einer früheren Studie in Kooperation mit Dr. Julia Bode (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) intrazerebral implantiert [307]. Jedoch zeigten sich bei den Tieren keine Anzeichen, die mit dem Wachstum eines Glioms einhergehen, wie zum Beispiel Gewichtsverlust oder Vernachlässigung der Körperhygiene, sodass der Versuch nach 10 Monaten beendet wurde. Von den Gehirnen der Tiere wurden serielle Schnitte angefertigt, auf welchen anschließend mittels immunohistochemischen Färbungen PRDX1 und MHC1 angefärbt wurden. Die Kontrollfärbung für MHC1, welches ausschließlich in der Membran der humanen Zellen zu detektieren sein sollte, zeigte eine minimale Färbung (Abb. 14 weisser Stern). Die Färbung von Hs683 Zellen aus der Kultur zeigte eine deutliche Färbung der Zellen (Abb. 14). Die Färbung von PRDX1 war etwas schwächer in den Tieren bei denen PRDX1<sup>KD</sup> Zellen implantiert wurden. Die Färbung gegen MHC1 zeigte eine punktuelle Färbung der Zellen in der Kontrollkondition als auch in bei PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 14). Jedoch waren die MHC1 positiven Zellen diffus über das Gehirn verteilt und es war in keiner der Konditionen eine Tumormasse erkennbar.



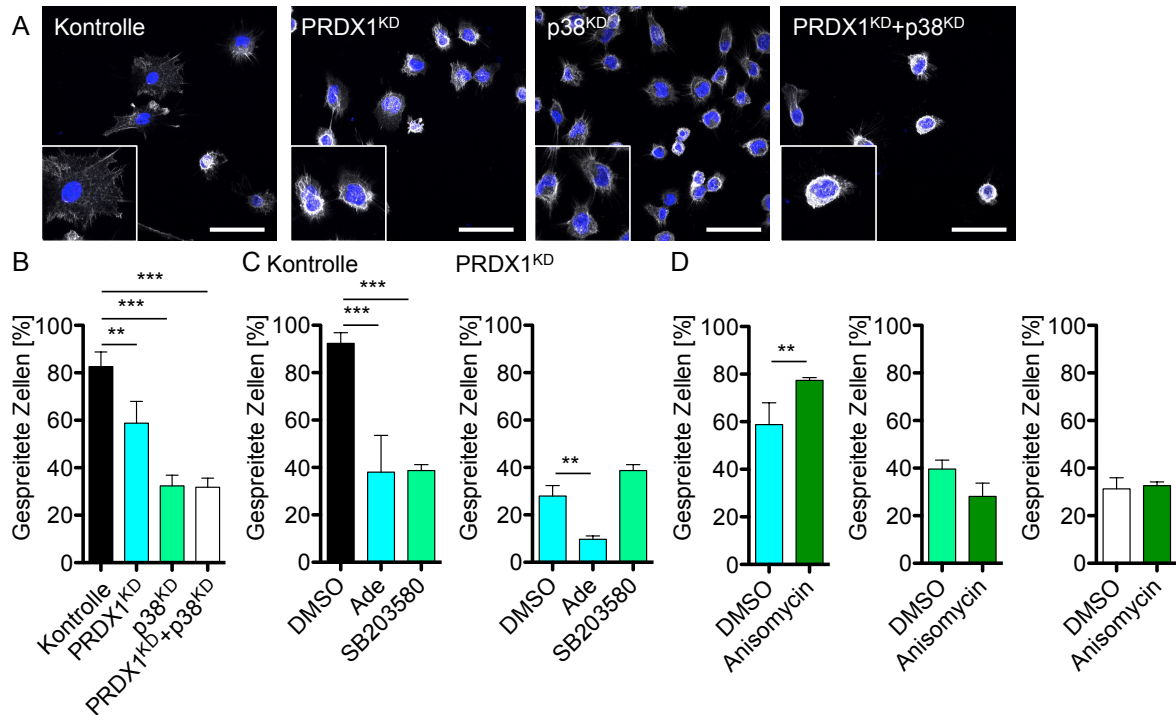
**Abb. 14 *In vivo* Analyse der Infiltration von Hs683 Gliomzellen.** Hs683 Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen wurden in immundefiziente NOD/SCID/γ Mäuse intrakranial implantiert. 10 Monate nach der Implantation wurden die Gehirne entnommen und die Verteilung der Gliomzellen analysiert (obere Reihe). Die untere Reihe zeigt, die Kontrollfärbung gegen MHC1 (rot) auf einem Gehirn ohne humane Gliomzellen und die Immunofluoreszenzfärbung von Hs683 Zellen *in vitro*. Der Maßstabsbalken entspricht 100 µm, sofern keine zusätzliche Beschriftung vorhanden ist. Rot – MHC1; Grün – PRDX1 und Blau – DAPI. Der weiße Stern markiert unspezifische rot fluoreszierende Signale in der Kontrollkondition.

### 5.7 Der Verlust von PRDX1 reguliert die Zellmorphologie von Gliomzellen über die Modulierung des Actin Zytoskeletts

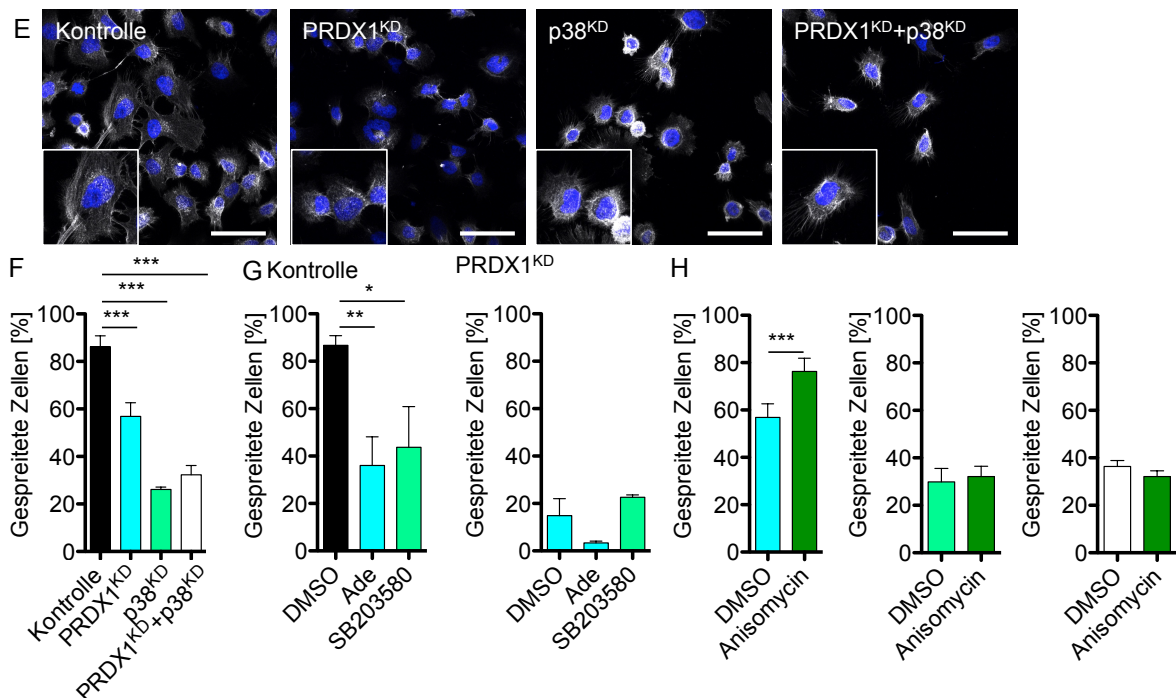
Die Zellmorphologie wurde durch eine Phalloidininfärbung des Actin Zytoskeletts adressiert. Die Morphologie der Hs683 und der Ln229 Zellen war identisch, sodass die folgende Beschreibung auf beide Zelltypen anwendbar ist. Die Kontrollzellen hatten eine gespreitete Morphologie mit einigen Lammelipodien, die sich durch eine diffuse Ansammlung von Actin Filamenten auszeichneten und Filopodien, die aus verlängerten Actinfilamenten

(F-Actin) bestehen. Insgesamt war die Fluoreszenzintensität relativ gering (Abb. 15A und E). Der Verlust von PRDX1, p38 MAPK oder beider Proteine führte zu eher rundlichen Zellen mit wenigen Zellausläufern, die - sofern vorhanden - eher Filopodien als Lammellipodien waren. Die Färbung des Zytoskeletts war intensiver als in den Kontrollzellen, aber auch eher zirkulär um den Nukleus lokalisiert (Abb. 15A und E). Die morphologischen Unterschiede wurden zusätzlich quantifiziert, hierzu wurden die gespreiteten und runden Zellen ausgezählt und die Prozentzahl der gespreiteten Zellen angegeben. Der Verlust von PRDX1 in Hs683 Zellen führte zu einer Reduktion der gespreiteten Zellen um 20%, während der Verlust von p38 MAPK und der doppelte Verlust die Anzahl an gespreiteten Zellen um über 50% senkte (Abb. 15B). Die Behandlung der Kontrollzellen mit Ade oder SB203580, um PRDX1 bzw. p38 MAPK zu inhibieren, führte in diesen Zellen zu einer Reduktion der gespreiteten Zellen um etwa 50% (Abb. 15C links). Die Inhibition von PRDX1 in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen konnte die Anzahl der gespreiteten Zellen um weitere 20% reduzieren, während die Behandlung mit SB203580 keinen signifikanten Effekt auf PRDX1<sup>KD</sup> Zellen hatte (Abb. 15C rechts). Zusätzlich zur Inhibition von p38 MAPK wurde der p38 MAPK Aktivator Anisomycin verwendet. Anisomycin ist ein Antibiotikum, welches von *Streptomyces griseolus* produziert wird und die Protein sowie DNA Synthese inhibiert [317]. Zusätzlich konnte durch die Behandlung mit Anisomycin eine Aktivierung der stressabhängigen Kinasen wie p38 MAPK beobachtet werden, wobei der zu Grunde liegende Mechanismus noch unklar ist [309, 312]. Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Anisomycin führte zu einem Anstieg von gespreiteten Zellen um 20% (Abb. 15D). Fehlt den Zellen jedoch p38 MAPK so konnte kein Effekt auf die Behandlung mit Anisomycin festgestellt werden (Abb. 15D). Die gleichen Quantifizierungen wurden für die Ln229 Zellen durchgeführt. Hierbei wurden für den Verlust von PRDX1, p38 MAPK und beider Proteine die gleichen Reduktionen wie in den Hs683 Zellen beobachtet. Der Verlust von PRDX1 führte zu einer 20%igen Reduktion an gespreiteten Zellen, während der Verlust von p38 MAPK und beider Proteine zu einer mehr als 50%igen Reduktion führte (Abb. 15F). Ebenso zeigte die Behandlung der Kontrollzellen mit Ade oder SB203580 eine Reduktion gespreiteter Zellen um 50% (Abb. 15G links). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade führte zu einer weiteren Reduktion der gespreiteten Zellen, welche jedoch nicht signifikant war. Die Behandlung mit SB203580 hatten ebenfalls keinen Effekt auf die Morphologie der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 15G rechts). Der p38 MAPK Aktivator Anisomycin führte bei den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zu einem Anstieg an gespreiteten Zellen um 20%, während der Verlust von p38 MAPK oder von beiden Proteinen die Änderung der Anzahl gespreiteter Zellen nach Anisomycin Behandlung verhinderte (Abb. 15H).

Hs683



Ln229



**Abb. 15 Analyse der Zellmorphologie und des Actin Zytoskeletts in Hs683 und Ln229 Gliomzellen.** (A) Die Morphologie von Hs683 Zellen und die Organisation der Actin Filamente wurde mittels Phalloidin-488 sichtbar gemacht. (B) Die Analyse der Zellmorphologie der Kontrollzellen zeigte, dass diese deutlich gespreiteter waren als die PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> oder PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen. (C) Die Behandlung mit Ade oder SB203580 führte ebenfalls zu der Reduktion von gespreiteten Kontrollzellen (links), während die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen lediglich eine zusätzliche Reduktion nach der Behandlung mit Ade zeigten (rechts). (D) Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> (links), p38<sup>KD</sup> (mitte) und PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> (rechts) mit Anisomycin erhöhte die Anzahl gespreiteter PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, während kein Effekt auf die p38 MAPK reduzierten Zellen zu sehen war. (E-H) Untersuchung der Ln229 Zellen identisch zu der Untersuchung der Hs683 Zellen. Der Maßstabsbalken misst 100 µm. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht p = 0.05, \*\* entsprechen p = 0.01 und \*\*\* entsprechen p = 0.001 hatte. Verglichen wurden

die Kontrollkonditionen mit der jeweiligen Proben wie PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> oder die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren wie Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust oder Inhibition von PRDX1; Grün – Verlust oder Inhibition von p38 MAPK; Weiß – Verlust von PRDX1 und p38 MAPK; Dunkelgrün – Aktivierung von p38 MAPK

### **5.8 PRDX1 moduliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen über die Regulation der Aktivierung des p38 MAPK Signalwegs**

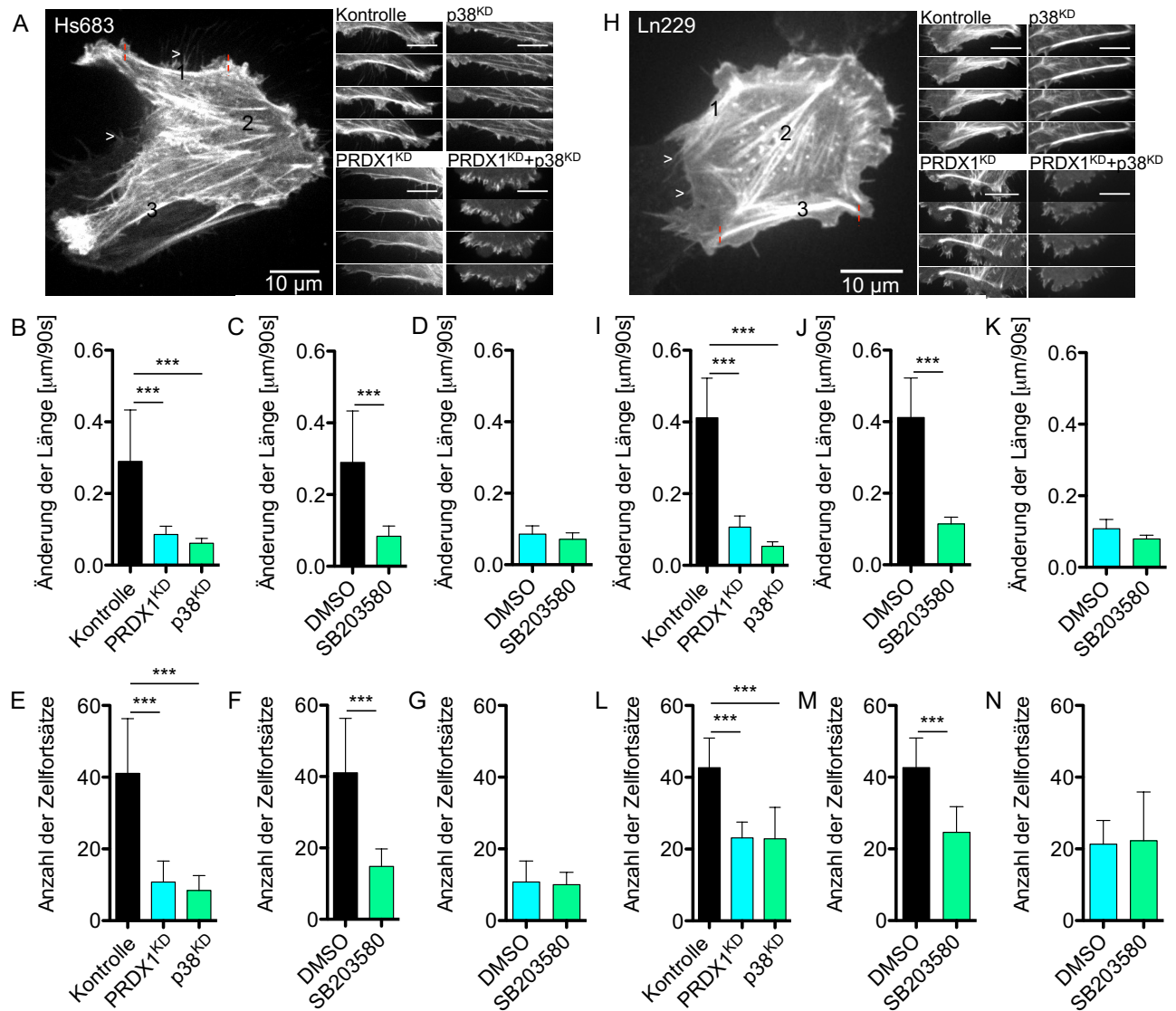
Die Motilität von Zellen beruht maßgeblich auf dem dynamischen Auf- und Abbau des Actin Zytoskeletts und den Fokaladhäsionen als Haftpunkte an der Oberfläche [192]. Im Folgenden wird der Einfluss von PRDX1 auf diese Dynamiken beschrieben.

Das Actin Zytoskelett wurde mit der Hilfe von *LifeAct-mCherry* angefärbt, sodass die dynamische Veränderung der Actin Filamente in lebenden Zellen aufgenommen werden konnten. *LifeAct* ist ein aus der Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) stammendes Lipid, welches ausschließlich an filamentöses Actin bindet [303]. In dieser Arbeit wurde die *LifeAct* Variante verwendet, die an ein *mCherry* Fluorophor gebunden ist und nach einer Anregung bei 587 nm mit einer Wellenlänge von 610 nm fluoresziert. Die Aufnahmen wurden an einem VoX Ti *Spinning Disk* Mikroskopie System durchgeführt und anschließend die Dynamik in Form der Längenänderung der Actin Filamente bestimmt. Exemplarisch zeigen die Abbildungen 16 A und H die Momentaufnahme einer *LifeAct-mCherry* exprimierenden Zelle. In jeder zu untersuchenden Zelle wurden drei Actin Filamente analysiert die an definierten Zellregionen positioniert waren, wie die Zahlen von eins bis drei in den Übersichtsaufnahmen anzeigen. Die Längendefinition der Actin Filamente ist durch rote gestrichelte Linien markiert, welche den Anfang und das Ende der hellsten Fluoreszenz zeigen. Als weitere Quantifizierung wurde die Anzahl der Filopodien bestimmt, da bei einer geringeren Actin Dynamik weniger Zellausläufer gebildet werden sollten. Die Filopodien sind exemplarisch mit Pfeilen markiert. Zusätzlich zeigen diese Abbildungen den zeitlichen Verlauf von jeweils einer quantifizierten Actin Faser. Es wurde ein Ausschnitt von 270 s gezeigt, wobei jedes Bild einen Abstand von 90 s hat. Der doppelte Verlust von PRDX1 und p38 MAPK führte zu dem Verlust von langen Actin Filamenten, sodass für die Hs683 und Ln229 PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen keine Analyse der Actin Filamente möglich war.

Dementsprechend wurde in den folgenden Auswertungen die Kontrolle und der einzelne Verlust von jeweils PRDX1 und p38 MAPK betrachtet. In den Hs683 Kontrollzellen betrug die Längenänderung pro 90 s im Durchschnitt 0.3 µm, während sowohl der Verlust von PRDX1 als auch von p38 MAPK die durchschnittliche Änderung auf etwa 0.1 µm/90 s reduzierte (Abb. 16B). Die Behandlung mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 führte in den PRDX1 exprimierenden Zellen ebenfalls zu einer Verminderung der Längenänderung von 0.3 µm/90 s auf 0.1 µm/90 s (Abb. 16C). In den Hs683 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen konnte nach der Behandlung mit SB203580 kein zusätzlicher Effekt auf die durchschnittliche Längenänderung der Actin Filamente festgestellt werden, die Längenänderung betrug mit und ohne SB203580

durchschnittlich 0.1  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  (Abb. 16D). Die Quantifizierung der Zellfortsätze bestätigte die Ergebnisse, die bei der Analyse der Längenänderung der Actin Filamente erzielt wurden. Betrachtet man zunächst den Verlust von PRDX1 oder p38 MAPK im Vergleich zu den Kontrollzellen konnte man eine Abnahme an Filopodien um etwa 75% beobachten. Die Kontrollzellen hatten im Schnitt 40 Filopodien pro Zelle, während die PRDX1<sup>KD</sup> oder p38<sup>KD</sup> Zellen lediglich 10 Stück aufwiesen (Abb. 16E). Die Behandlung mit SB203580 reduzierte die Anzahl der Filopodien in Kontrollzellen von durchschnittlich 40 auf etwas weniger als 20 pro Zelle (Abb. 16F), während SB203580 auf PRDX1<sup>KD</sup> Zellen keinen weiteren Effekt hatte (Abb. 16G). In Ln229 Gliomzellen zeigten die gleichen Effekte wie in Hs683 Zellen. Der Verlust von PRDX1 oder p38 MAPK führte zu einem Abfall der Längenänderung pro 90s der Actin Filamente von 0.4  $\mu\text{m}$  auf durchschnittlich 0.1  $\mu\text{m}$  (Abb. 16I). Die Inhibierung von p38 MAPK mit SB203580 reduzierte die Änderung der Länge der Actin Filamente von 0.4  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  auf ebenfalls 0.1  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  (Abb. 16J). Die Behandlung der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit SB203580 zeigte jedoch keine signifikante Änderung der Actin Filament Längen über die Zeit (Abb. 16K). Die Analyse der Zellfortsätze bestätigte die Ergebnisse der Actin Dynamik in den Ln229 Zellen ebenfalls. Die Kontrollzellen wiesen durchschnittlich 40 Zellfortsätze pro Zelle auf. Der Verlust von PRDX1 oder p38 MAPK reduzierte die Anzahl der Filopodien auf etwa 20 Filopodien pro Zelle (Abb. 16L). Die Behandlung mit SB203580 verringerte die Anzahl der Filopodien von 40 in den Kontrollzellen auf 20 (Abb. 16M). PRDX1<sup>KD</sup> Zellen hatten durchschnittlich 20 Filopodien pro Zelle und zeigten keinen weiteren Einfluss durch die Behandlung mit SB203580. Die mit SB203580 behandelten PRDX1<sup>KD</sup> Zellen hatten im Schnitt ebenfalls etwa 20 Filopodien pro Zelle (Abb. 16N).





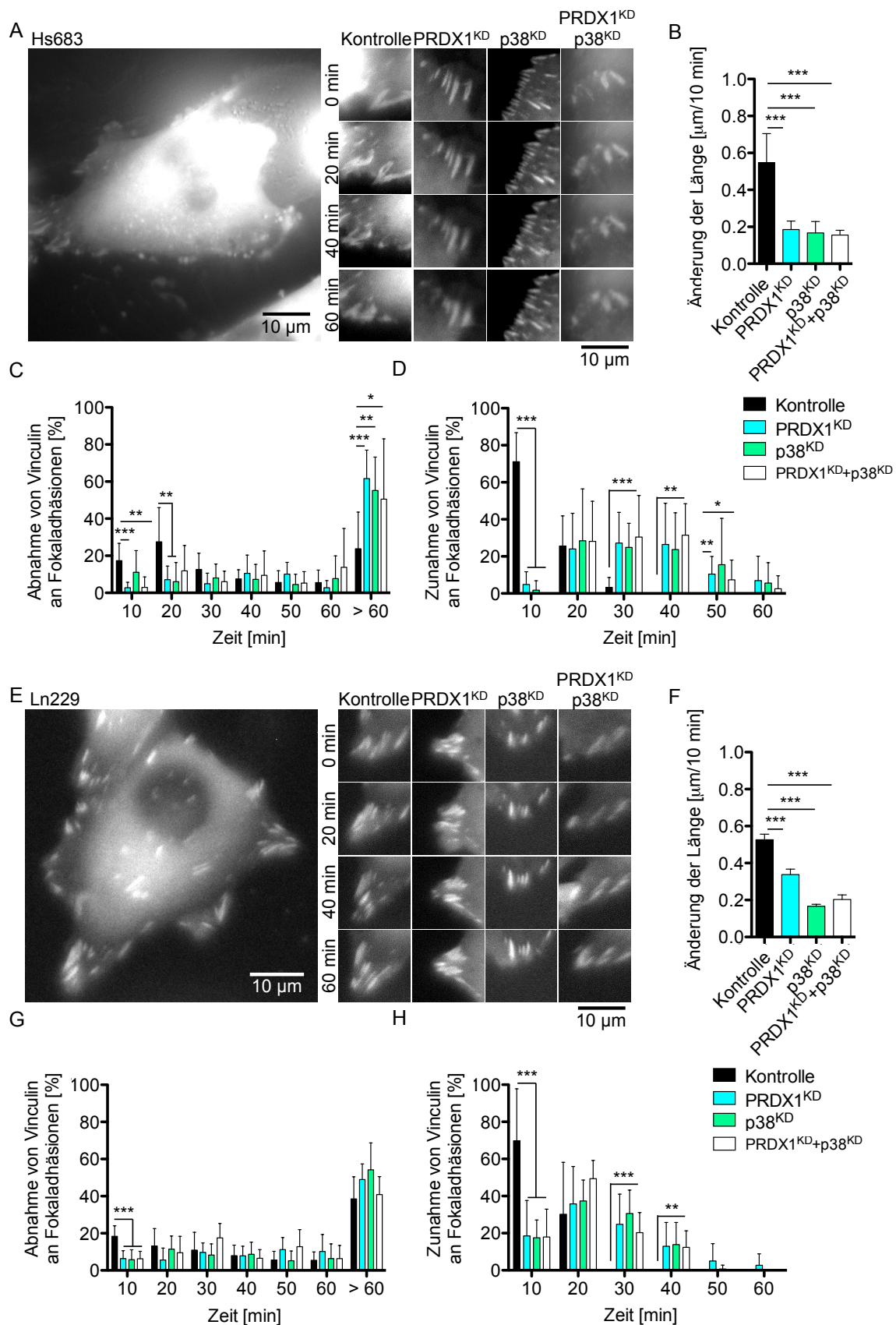
**Abb. 16 PRDX1 reguliert die Dynamik der Actin Filamente in lebenden Hs683 und Ln229 Zellen.**

(A,H) Übersichtsaufnahme der *LifeAct-mCherry* exprimierenden Hs683 (A) und Ln229 (H) Zellen mit Markierungen für die zu analysierenden Actin Filamente (1-3), Actin Filament Länge (Rote gestrichelte Linien) und exemplarischer Filopodien (Pfeilspitzen). Des Weiteren wurde ein Zeitverlauf beispielhafter Actin Filamente gezeigt. (B,I) Analyse der durchschnittlichen Längenänderung der Actin Filamente in Hs683 (B) und Ln229 (I) Zellen mit modifizierter Proteinexpression für PRDX1 oder p38 MAPK. (C,J) Analyse der durchschnittlichen Längenänderung von Actin Filamenten in Kontrollzellen im Vergleich zu SB203580 behandelten Zellen. (D+K) Zellen mit modifizierter Proteinexpression für PRDX1 oder p38 MAPK. (C,J) Analyse der durchschnittlichen Längenänderung von Actin Filamenten in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Vergleich zu SB203580 behandelten Zellen. (E,L) Analyse der Filopodien Anzahl in Hs683 (E) und Ln229 (L) Zellen mit entweder PRDX1<sup>KD</sup> oder p38<sup>KD</sup> im Vergleich zu Kontrollzellen. (F,M) Quantifizierung der Filopodien Anzahl der Kontrollzellen nach der Behandlung mit SB203580. (G,N) Analyse der Filopodien Anzahl von Actin Filamenten in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Vergleich zu SB203580 behandelten Zellen. Die Länge des Maßstabsbalken beträgt 10 μm. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht p = 0,05, \*\* entsprechen p = 0,01 und \*\*\* entsprechen p = 0,001 hatte. Verglichen wurden die Kontrollkonditionen mit der jeweiligen Proben wie PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> oder die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren wie Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust oder Inhibition von PRDX1; Grün – Verlust oder Inhibition von p38 MAPK

Analog zu der Analyse der Actin Dynamik wurde für die Untersuchung der Fokaladhäsionen ein fluoreszierender Marker transient in die Zellen eingebracht. In diesem Fall wurde an *mCherry* gekoppeltes Vinculin als Marker verwendet. 24 Stunden nach der Transfektion war die Expression des Konstruktes ausreichend, um die Zellen mit einem Epifluoreszenzmikroskop über eine Stunde aufzunehmen. Die Abbildungen 17A und E zeigen neben der Übersichtsaufnahme einer Zelle auch einen zeitlichen Verlauf exemplarischer Fokaladhäsionen über 60 min für die Hs683 und Ln229 Zellen. Quantifiziert wurde neben der Zu- und Abnahme des Vinculingehaltes der Fokaladhäsionen über die Zeit auch die Längenänderung. In den Hs683 Zellen konnte zunächst für die Längenänderung eine durchschnittliche Änderung von 0.55  $\mu\text{m}/10 \text{ min}$  für die Kontrollzellen gemessen werden. Der Verlust von PRDX1, p38 MAPK oder beider Proteine reduzierte die durchschnittliche Längenänderung auf 0.2  $\mu\text{m}/10 \text{ min}$  (Abb. 17B). Weiterhin wurde der Abbau der Fokaladhäsionen über die Zeit beobachtet, indem die Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen analysiert wurde. Hierbei waren die Fokaladhäsionen der Hs683 Zellen mit PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> oder PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> deutlich stabiler als die der Kontrollzellen. Dies zeigte sich darin, dass signifikant mehr Fokaladhäsionen der Kontrollzellen innerhalb von 20 min abgebaut wurden und in den PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> und PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen wesentlich mehr Fokaladhäsionen über 60 min beständig waren (Abb. 17C). Die Zeitpunkte zwischen 30 min und 60 min zeigten keine Unterschiede für die Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen. Im Umkehrschluss wurde ebenfalls die Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen untersucht. 90% der Fokaladhäsionen der Hs683 Kontrollzellen lagerten Vinculin innerhalb von 20 min ein, während die Zellen mit einem Verlust von PRDX1, p38 MAPK oder dem doppelten Verlust zum Aufbau von 90% ihrer Fokaladhäsionen zwischen 20 min und 40 min benötigten (Abb. 17D). Die Unterschiede in der Einlagerung von Vinculin in Fokaladhäsionen waren zwischen Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> und PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen für 10 min, 30 min, 40 min und 50 min signifikant. Die Analyse der Ln229 Zellen bestätigte die für die Hs683 erzielten Ergebnisse. Die Längenänderung der Fokaladhäsionen betrug für die Kontrollzellen durchschnittlich 0.5  $\mu\text{m}/10 \text{ min}$ , während die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen lediglich eine Änderung von durchschnittlich 0.3  $\mu\text{m}/10 \text{ min}$  und die p38<sup>KD</sup> und PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen von 0.2  $\mu\text{m}/10 \text{ min}$  aufwiesen (Abb. 17F). Die Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen war in den ersten 10 min in den Kontrollzellen um 10% höher im Vergleich zu allen anderen Zellen. An allen anderen Zeitpunkten konnten keine nennenswerten Unterschiede beobachtet werden (Abb. 17G). Die Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen war in den Kontrollzellen deutlich beschleunigt. Innerhalb von 10 min bis 20 min konnte eine Zunahme von Vinculin an 90% der Fokaladhäsionen der Kontrollzellen beobachtet werden, während die PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> und die PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> Zellen zwischen bis zu 40 min benötigten, um einen entsprechende Vinculinanreicherung auf



zuweisen (Abb. 17H).



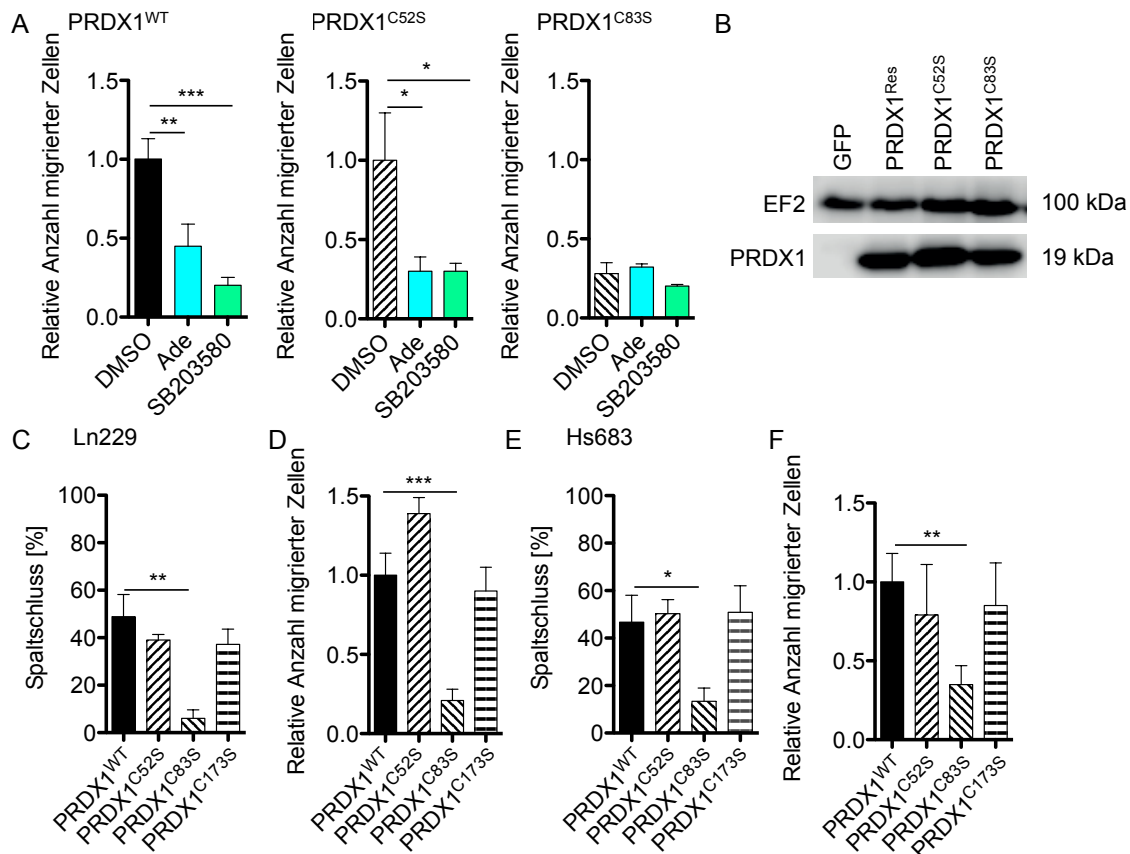
**Abb. 17 PRDX1 reguliert die dynamische Veränderung von Fokaladhäsionen in Hs683 und Ln229 Gliomzellen.** (A,E) Übersicht und beispielhafter Zeitverlauf der Vinculin-*mCherry* exprimierenden Hs683 (A) und Ln229 (E) Zellen. (B,F) Quantifizierung der durchschnittlichen

Längenänderung der Fokaladhäsionen in Hs683 (B) und Ln229 (F) Zellen. (C+G) Analyse der Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen in Hs683 (C) und Ln229 (G) Zellen. (D,H) Quantifizierung der Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen von Hs683 (D) und Ln229 (H) Zellen. Die Länge des Maßstabsbalken beträgt 10  $\mu\text{m}$ . Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte. Verglichen wurden die Kontrollkonditionen mit der jeweiligen Proben wie PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> oder die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren wie Ade oder SB203580. Schwarz – Kontrolle; Blau – Verlust von PRDX1; Grün – Verlust von p38 MAPK; Weiß – Doppelter Verlust von PRDX1 und p38 MAPK

### 5.9 PRDX1 reguliert die Motilität von Gliomzellen unabhängig von dessen Peroxidaseaktivität

Erste Versuche mit Mutanten von PRDX1 zeigten, dass nicht die Peroxidasefunktion sondern die Chaperonfunktion von PRDX1 die Motilität von Gliomzellen reguliert. Das Ziel der Mutation war es spezifisch durch den Austausch von Cysteinen zu Serinen die gewünschte Funktion von PRDX1 zu deletieren. Die Peroxidaseaktivität wird über das Zusammenspiel der Cysteine an Position 52 und 173 (Cys52 und Cys173) reguliert, während die Chaperonfunktion maßgeblich durch ein Cystein-Rest an Position 83 (Cys83) erfolgt [153].

Zunächst wurden PRDX1 Mutanten in den NCH1681 Gliomzellen exprimiert. Die hierzu verwendeten Mutanten waren PRDX1<sup>C52S</sup>, bei der das Cys52 durch ein Serin ersetzt wurde und PRDX1<sup>C83S</sup>, bei der das Cys83 gegen Serin ausgetauscht wurde. Die Expression wurde mittels *Western Blot* kontrolliert und zeigte eine gleichmäßige Expression aller Konstrukte (Abb. 18B). Der Einfluss auf die Migration wurde mit Hilfe eines *Boyden Chamber* Migrationversuchs untersucht. Hierbei zeigte sich, dass lediglich die Expression der PRDX1<sup>C52S</sup> Mutante die Anzahl migrierter Zellen auf ein mit den PRDX1<sup>WT</sup> vergleichbares Niveau erhöhte (Abb. 18A). Die Expression von PRDX1<sup>C83S</sup> zeigte eine um fast 75% geringere Migration im Vergleich zu PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C52S</sup> (Abb. 18A). Die Behandlung mit Ade oder SB203580 reduzierte die Anzahl an migrierten Zellen in PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C52S</sup> exprimierenden NCH1681 Zellen um etwas mehr als die Hälfte im Vergleich zu den DMSO behandelten Kontrollen (Abb. 18A). Die Behandlung von PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen mit Ade oder SB203580 hatte keinen weiteren Effekt auf die Migration der Zellen (Abb. 18A).

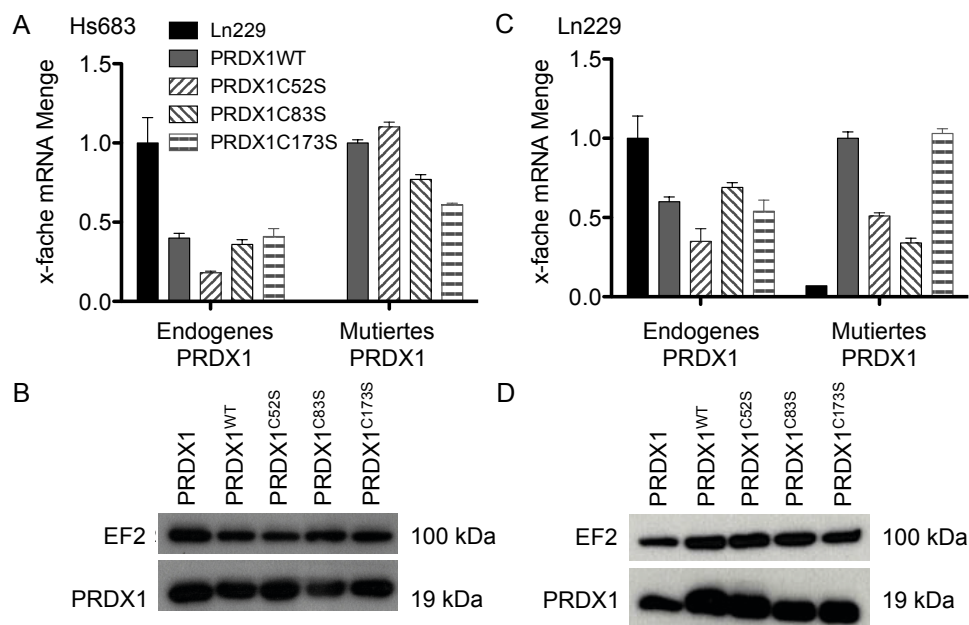


**Abb. 18 Das Cystein an Position 83 ist essentiell für den Einfluss von PRDX1 auf die Gliomzellmigration.** (A) Analyse der Migration der NCH1681 Gliomzellen mit Hilfe des *Boyden Chamber* Migrationsversuchs. Die Zellen exprimierten entweder PRDX1<sup>WT</sup> (links), PRDX1<sup>C52S</sup> (mitte) oder PRDX1<sup>C83S</sup> (rechts) exprimieren und entweder mit Ade (blau) oder SB203580 (grün) behandelt wurden. (B) Proteinexpression der PRDX1 Varianten in NCH1681 Zellen. (C,E) Motilitätsanalyse der Ln229 (C) und Hs683 (E) Zellen, deren endogene PRDX1 Expression reduziert und die Expression der PRDX1 Varianten eingebracht wurde. (D,F) *Boyden Chamber* Migrationsversuch der Ln229 (D) und Hs683 (F) Zellen. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht p = 0.05, \*\* entsprechen p = 0.01 und \*\*\* entsprechen p = 0.001 hatte. Verglichen wurden die Kontrollkonditionen mit der jeweiligen Proben wie zum Beispiel PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> oder die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren wie Ade oder SB203580.

Zur weiteren Verifizierung wurde ein Konstrukt verwendet, welches zum einen eine shRNA gegen den 5' UTR der endogenen *PRDX1* mRNA trägt sowie ein *PRDX1* Gen, dass entweder unverändert blieb (PRDX1<sup>WT</sup>) oder eine Mutation (PRDX1<sup>C52S</sup>, PRDX1<sup>C83S</sup> oder PRDX1<sup>C173S</sup>) trägt. Diese Plasmide wurden von Peter Wirthschaft zur Verfügung gestellt und ermöglichten die Validierung der Ergebnisse mit den Ln229 und Hs683 Zellen. Die Analyse der mRNA- und Proteinexpression zeigte für die Hs683 Zellen eine Reduktion der endogenen mRNA um durchschnittlich 50% für alle Konstrukte und eine gleichmäßige Überexpression der unterschiedlichen PRDX1 Varianten (Abb. 19A). Auf Proteinebene war eine gleichmäßige Expression von PRDX1 zu sehen (Abb. 19B). Für die Ln229 Zellen war die Reduktion der endogenen mRNA ebenfalls um die 50% für die unterschiedlichen Konstrukte, während die Expressionen der PRDX1 Varianten auf mRNA Ebene variierten. Die mRNAs der PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> wurden gleich stark exprimiert, während die

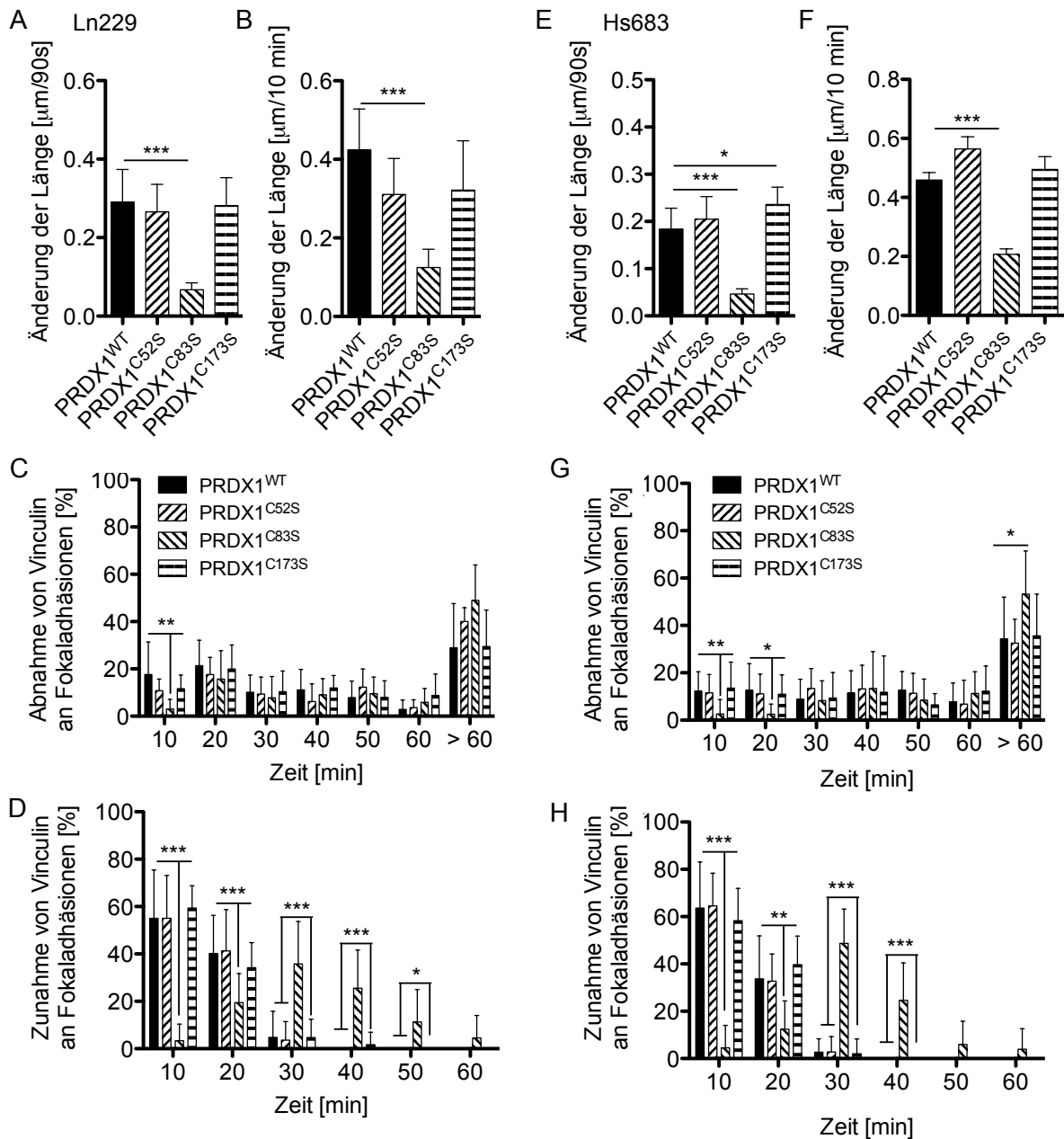
mRNA Mengen von *PRDX1*<sup>C52S</sup> und *PRDX1*<sup>C83S</sup> nur etwa die Hälfte betrug (Abb. 19C). Auf Proteinebene konnten jedoch gleichmäßige Mengen von PRDX1 detektiert werden (Abb. 19D). Für beide Zelllinien wurde neben dem *Boyden Chamber* Migrationsversuch ebenfalls ein *Scratch Assay* durchgeführt. Die Ln229 Zellen, die entweder PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> oder PRDX1<sup>C173S</sup> exprimieren, verringerten den Spalt durchschnittlich um 40%, während die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Ln229 Zellen den Spalt lediglich um 10% verringern konnten (Abb. 18C). Die Hs683 Zellen zeigten ähnliche Werte wie die Ln229 Zellen im *Scratch Assay*. PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> exprimierende Zellen verringerten den Spalt um 40%, während die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen die Spaltbreite lediglich um 15% in gleicher Zeit reduzierten (Abb. 18E). Im *Boyden Chamber* Migrationsversuch war sowohl für die Ln229 Zellen als auch für die Hs683 Zellen eine Reduktion der Migration für die PRDX1<sup>C83S</sup> Variante zu beobachten, während bei allen anderen PRDX1 Varianten (PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup>) keine Unterschiede in der Anzahl migrierter Zellen erkennbar war (Abb. 18D und F). Zusätzlich wurde die Dynamik der Actin Filamente und der Fokaladhäsionen im Hinblick auf die PRDX1 Varianten untersucht. Die Längenänderung der Actin Filamente war für die Ln229 PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> ähnlich und betrug durchschnittlich 0.3 µm/90 s. Die Expression von PRDX1<sup>C83S</sup> in Ln229 Zellen verringerte die durchschnittliche Längenänderung auf 0.1 µm/90 s (Abb. 20A). Die Expression von PRDX1<sup>WT</sup> oder PRDX1<sup>C52S</sup> in Hs683 Zellen führte zu einer durchschnittlichen Längenänderung der Actin Filamente um 0.2 µm/90 s (Abb. 20E). Die Expression des PRDX1<sup>C173S</sup> Konstrukts erhöhte die durchschnittliche Längenänderung der Actin Filamente auf 0.25 µm/90 s, während die Expression des PRDX1<sup>C83S</sup> Konstrukts die durchschnittliche Längenänderung auf 0.05 µm/90 s reduzierte (Abb. 20E). Die Analyse der Fokaladhäsionen zeigte für die Längenänderung der Fokaladhäsionen eine signifikante Reduktion von 0.4 µm/10 min der Ln229 PRDX1<sup>WT</sup> Zellen auf 0.15 µm/10 min in den PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen (Abb. 20B). Die Ln229 Zellen, die das PRDX1<sup>C52S</sup> oder das PRDX1<sup>C173S</sup> Konstrukt exprimierten, zeigten eine durchschnittliche Längenänderung von 0.3 µm/10 min ohne signifikante Differenz zu der PRDX1<sup>WT</sup> Kontrolle (Abb. 20B). Für die Hs683 Zellen verhielt sich die Längenänderung ähnlich, die PRDX1<sup>WT</sup> exprimierenden Zellen hatten eine durchschnittliche Längenänderung von 0.45 µm/10 min, während die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen ihre Fokaladhäsionen lediglich um 0.2 µm/10 min in der Länge veränderten (Abb. 20F). Die PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> exprimierenden Zellen hatten eine durchschnittliche Änderung der Länge von 0.55 µm/10 min und 0.5 µm/10 min und zeigten somit keinen signifikanten Unterschied zu den PRDX1<sup>WT</sup> Zellen (Abb. 20F). Wie schon zuvor wurde die Ab- und Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen über die Zeit bestimmt. Hierbei zeigte sich in den Ln229 Zellen erwartungsgemäß, dass die PRDX1<sup>WT</sup> Variante ähnlich wie schon die Kontrollzellen aus den vorherigen Versuchen die meisten

Fokaladhäsionen innerhalb von 10 min abbauten (Abb. 20C). Die Expression der PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> Varianten wies die gleiche Dynamik für die Abwanderung von Vinculin an den Fokaladhäsionen auf wie die PRDX1<sup>WT</sup> Expression (Abb. 20C). Im Vergleich zu dieser Dynamik konnte nach der Expression von PRDX1<sup>C83S</sup> eine reduzierte Abnahme von Vinculin an den bestehenden Fokaladhäsionen beobachtet werden (Abb. 20C). Für die späteren Zeitpunkte von 20 min bis über 60 min konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den verschiedenen PRDX1 Varianten gezeigt werden. Deutlicher war die Auswertung der Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen der entsprechenden Ln229 Zellen. Die Varianten PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> lagerten Vinculin innerhalb von 20 min in 90% ihrer Fokaladhäsionen ein, während die Zellen mit PRDX1<sup>C83S</sup> um gleiche Vinculinlevel an den Fokaladhäsionen zu erreichen bis zu 50 min benötigten (Abb. 20D). Ähnliche Ergebnisse konnten mit der Hs683 Zelllinie erzielt werden. Hierbei zeigte sich, dass die Zellen, die die PRDX1 Varianten PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> exprimieren, signifikant mehr Vinculin innerhalb von 20 min aus den Fokaladhäsionen verlieren als die Zellen mit PRDX1<sup>C83S</sup> (Abb. 20G). Die Expression von PRDX1<sup>C83S</sup> führte weiter dazu, dass nach 60 min deutlich mehr Fokaladhäsionen bestehen blieben als bei der Expression der anderen Varianten (Abb. 20G). Die Einlagerung von Vinculin an den Fokaladhäsionen fand in den PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> exprimierenden Hs683 Zellen hauptsächlich innerhalb von 20 min statt, während die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen bis zu 40 min benötigten, um gleiche Vinculinlevel an den Fokaladhäsionen zu erreichen (Abb. 20H).



**Abb. 19 Expressionsanalyse der Kombinationsplasmiden**, die die endogene Expression von PRDX1 reduziert und im Gegenzug die Expression der PRDX1 Varianten (PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup>, PRDX1<sup>C83S</sup> oder PRDX1<sup>C173S</sup>) einbringt. (A,C) Quantifizierung der Transkripte für endogenes und mutiertes PRDX1. Die mRNA Mengen wurden relativ zu der Menge an PGK mRNA bestimmt und auf die mRNA Menge der Kontrollzellen normalisiert. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht p = 0.05, \*\*

entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte. (B,D) Verifizierung der PRDX1 Expression auf Proteinebene.



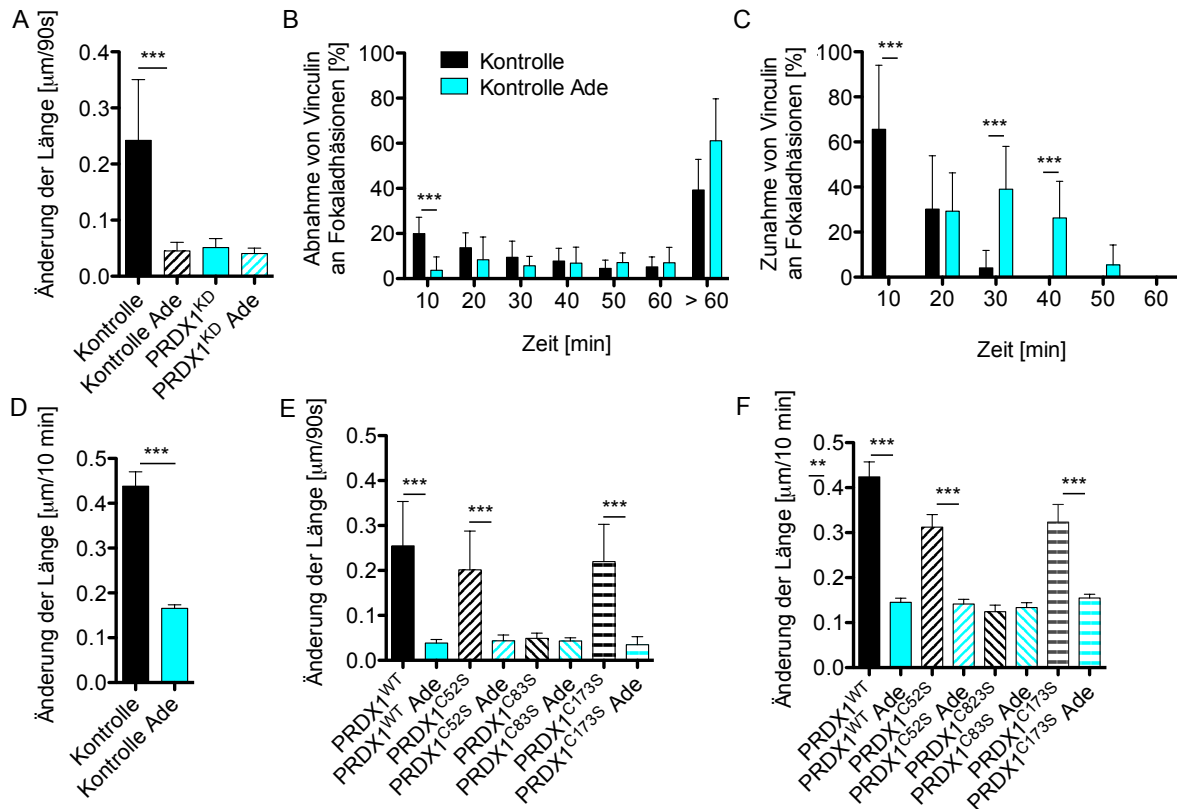
**Abb. 20 Das funktionelle Cystein an Position 83 von PRDX1 ist essentiell für dessen Einfluss auf das Actin Zytoskelett und Fokaladhäsionen.** (A,E) Analyse der dynamischen Änderung der Actin Filamenten der Ln229 (A) und Hs683 (E) Zellen, die unterschiedliche Varianten von PRDX1 exprimieren. (B,F) Analyse der dynamischen Änderung der Länge von Actin Filamenten der Ln229 (A) und Hs683 (E) Zellen, die unterschiedliche Varianten von PRDX1 exprimieren. (C,G) Analyse der Vinculinabnahme an den Fokaladhäsionen in Ln229 (C) und Hs683 (G) Zellen, die die verschiedenen PRDX1 Varianten exprimieren. (D,H) Analyse der Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen von Ln229 (D) und Hs683 (H) Zellen, die verschiedene Varianten von PRDX1 exprimieren. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte.

### 5.10 PRDX1 – ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Behandlung von Patienten mit Gliomen?

Die durchgeführten Experimente zeigen, dass die Inhibition von PRDX1 in PRDX1 exprimierenden Zellen den Phänotyp der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen widerspiegelt. Dem zu Folge wurde der Einfluss einer Ade Behandlung auf die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen zusätzlich zu den Migrations- und Invasionsversuchen, die oben beschrieben wurden, untersucht. Hierbei wurden alle Versuche in den Ln229 Zellsystem durchgeführt und im Folgenden beschrieben.

Die Längenänderung der Actin Filamente betrug durchschnittlich 0.25  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  für die Kontrollzellen und konnte durch den Einsatz von 4  $\mu\text{M}$  Ade auf 0.05  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  reduziert werden (Abb. 21A). Die Längenänderung von 0.05  $\mu\text{m}/90\text{ s}$  entsprach der Änderung, die in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zu beobachten war. Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade hatte keinen zusätzlichen Effekt auf die Dynamik von Actin Filamenten. Die Analyse der Dynamik der Fokaladhäsionen war für die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Hinblick auf die Behandlung mit Ade nicht möglich, da die Behandlung dazu führte, dass keine Lokalisation von Vinculin an den Fokaladhäsionen detektierbar war. Im Vergleich zu den PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, die nicht mit Ade behandelt wurden, war in den behandelten PRDX1<sup>KD</sup> Zellen eine diffuse Verteilung der von Vinculin ausgehenden Fluoreszenz sichtbar und keine Anlagerung an Fokaladhäsionen. Dementsprechend wurden in den folgenden Auswertungen jeweils die Behandlung der Kontrollzellen mit DMSO und Ade verglichen. Die Zu- und Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen wurde wieder als Maß für die Dynamik der Fokaladhäsionen verwendet. Die Abnahme von Vinculin zeigte, dass die Kontrollzellen 20% ihrer Fokaladhäsionen innerhalb der ersten 10 min abbauen, während die Behandlung mit Ade die Abnahme von Vinculin auf 5% innerhalb von 10 min reduzierte (Abb. 21B). Allerdings führte die Behandlung mit Ade dazu, dass - im Vergleich zu DMSO behandelten Zellen - 20% mehr Fokaladhäsionen länger als 60 min stabil Vinculin einlagerten (Abb. 21B). Auch die Analyse der Zunahme von Vinculin in Fokaladhäsionen zeigte signifikante Unterschiede zwischen der Kontrolle und der Ade Behandlung. Die Kontrollzellen zeigten wie schon zuvor, dass fast das komplette Vinculin an Fokaladhäsionen innerhalb von 20 min akkumuliert wurde (Abb. 21C). Die Behandlung mit Ade führte dazu, dass die Zellen zwischen 20 min und 50 min benötigten um gleiche Mengen an Vinculin an den Fokaladhäsionen zu lokalisieren (Abb. 21C). Zusätzlich wurde die dynamische Veränderung von Fokaladhäsionen über die Zeit beobachtet indem die Längenänderung über die Zeit analysiert wurde. Die Behandlung der Zellen mit Ade reduzierte die Längenänderung von 0.45  $\mu\text{m}/10\text{ min}$  (Kontrollzellen) auf 0.15  $\mu\text{m}/10\text{ min}$  (Abb. 21D).

Ln229



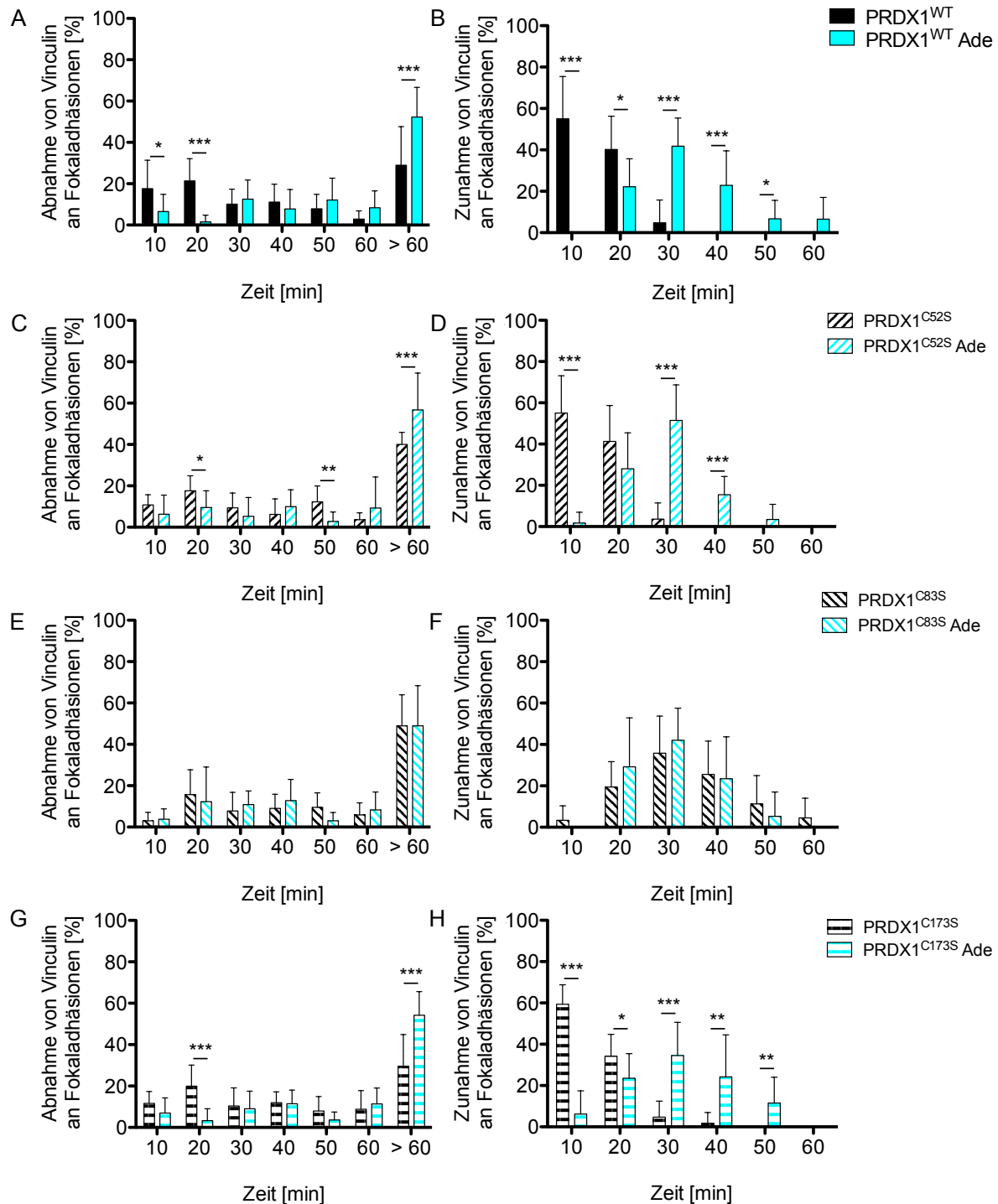
**Abb. 21 Ade hat den gleichen Effekt wie der Verlust von PRDX1 auf die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen.** (A) Quantifizierung der durchschnittlichen Längenänderung der Actin Filamente in Ln229 Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, die mit Ade behandelt wurden. Schwarz – Kontrolle; Schwarz schraffiert – Kontrolle mit Ade; Blau – PRDX1<sup>KD</sup>; Blau schraffiert – PRDX1<sup>KD</sup> mit Ade (B) Analyse der Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen von Ln229 Kontrollzellen, die mit Ade behandelt wurden. (C) Analyse der Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen von Ln229 Kontrollzellen, die mit Ade behandelt wurden. (D) Quantifizierung der durchschnittlichen Längenänderung von Ln229 Kontrollzellen, die mit Ade behandelt wurden. Schwarz – Kontrolle; Blau – PRDX1<sup>KD</sup> (E) Änderung der Dynamik der Actin Filamente in Ln229 Zellen, die verschiedene PRDX1 Varianten exprimieren und mit Ade behandelt wurden. (F) Änderung der Länge der Fokaladhäsionen in Ln229 Zellen, die verschiedene PRDX1 Varianten exprimieren und mit Ade behandelt wurden. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte.

Des Weiteren sollte im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden, ob der Effekt von Ade auf die Motilität von Gliomzellen über die Chaperonfunktion gesteuert wird. Hierfür wurden die bereits im letzten Abschnitt beschriebenen Konstrukte, die das endogene PRDX1 reduzieren und im Gegenzug zu der Expression der unterschiedlichen PRDX1 Varianten führen, in den Ln229 Zellen verwendet. In diesen Zellen wurden ebenfalls die dynamischen Modulationen von Actin Zytoskelett und Fokaladhäsionen untersucht. Die Analyse der Dynamik des filamentösen Actins zeigte, dass Ade in den PRDX1<sup>WT</sup> exprimierenden Zellen zu einer Reduktion der Längenänderung der Actin Filamente von  $0.25 \mu\text{m}/90 \text{ s}$  auf  $0.05 \mu\text{m}/90 \text{ s}$  führt (Abb. 21E). Ebenso konnte die Ade Behandlung die Längenänderung der Actin Filamente in Zellen, die PRDX1<sup>C52S</sup> oder PRDX1<sup>C173S</sup> exprimieren, von  $0.2 \mu\text{m}/90 \text{ s}$  auf  $0.05 \mu\text{m}/90 \text{ s}$  senken. Im Vergleich mit den PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen war zu beobachten, dass



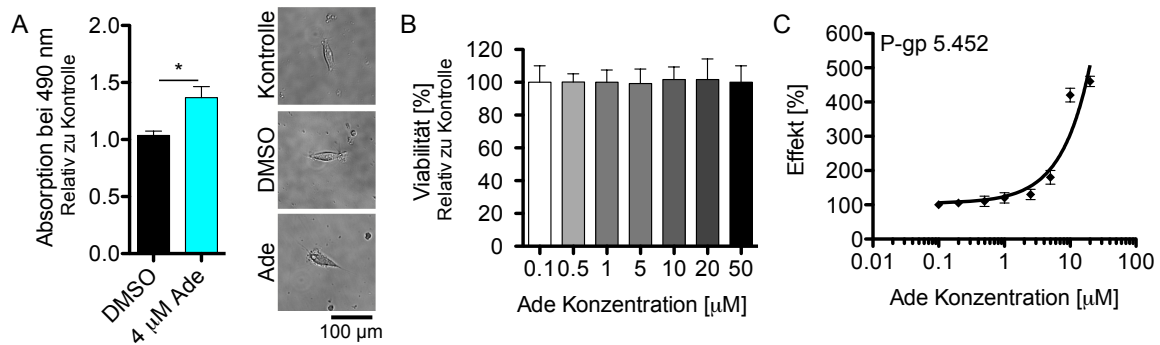
die Ade Behandlung der PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup>, die Längenänderung auf das Niveau der PRDX1<sup>C83S</sup> Zellen senkt. Die Behandlung von PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen mit Ade zeigte jedoch keinen weiteren Effekt auf die Dynamik der Actin Filamente (Abb. 21E). Ähnliches war für die Längenänderung der Fokaladhäsionen zu beobachten. Die Behandlung von PRDX1<sup>WT</sup> Zellen mit Ade reduzierte die durchschnittliche Längenänderung von 0.4 µm/10 min auf 0.15 µm/10 min. Die durchschnittliche Längenänderung von 0.15 µm/10 min entsprach der Längenänderung, die bei den PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen beobachtet werden konnte. Die Expression der PRDX1<sup>C52S</sup> oder PRDX1<sup>C173S</sup> Varianten führte zu einer durchschnittlichen Änderung der Fokaladhäsionslängen von 0.3 µm/10 min. Die durchschnittliche Änderung wurde bei beiden Varianten in Folge der Ade Behandlung auf 0.15 µm/10 min gesenkt (Abb. 21F). Die Analyse der Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen zeigte, dass die Behandlung mit Ade dazu führte, dass die Akkumulation von Vinculin an den Fokaladhäsionen verzögert auftrat und Vinculin länger in den Fokaladhäsionen verweilte (Abb. 22). Es war zu beobachten, dass die PRDX1<sup>WT</sup> Zellen innerhalb von 20 min deutlich mehr Vinculin enthaltende Fokaladhäsionen vorbringen als die mit Ade behandelten PRDX1<sup>WT</sup> Zellen. Im Gegenzug war das Vinculin an den Fokaladhäsionen in den mit Ade behandelten PRDX1<sup>WT</sup> Zellen deutlich stabiler, sodass 25% mehr Fokaladhäsionen länger als 60 min bestanden als in den DMSO behandelten Zellen (Abb. 22A). Die Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen war bei den mit Ade behandelten PRDX1<sup>WT</sup> Zellen deutlich verzögert im Vergleich zu den Kontrollzellen. Wie schon zuvor konnte für die PRDX1<sup>WT</sup> Zellen beobachtet werden, dass nahe zu alle Fokaladhäsionen binnen 20 min Vinculin einlagerten. Die Behandlung mit Ade führte jedoch dazu, dass die PRDX1<sup>WT</sup> Zellen zwischen 20 min und 60 min benötigten, um vergleichbare Vinculinmengen an den Fokaladhäsionen zu akkumulieren (Abb. 22B). Die Analyse der PRDX1<sup>C52S</sup> exprimierenden Zellen lieferte ähnliche Ergebnisse wie die PRDX1<sup>WT</sup> Zellen. Die mit Ade behandelten Zellen zeigten nach 20 min und 50 min eine deutlich geringere Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 22C). Zusätzlich konnte auch hierbei beobachtet werden, dass an 10% mehr Fokaladhäsionen nach 60 min noch Vinculin lokalisiert war. Die Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen zeigte ähnlich wie schon bei den PRDX1<sup>WT</sup> exprimierenden Zellen, dass in den Kontrollzellen das Vinculin innerhalb von 20 min an den Fokaladhäsionen akkumuliert wurde (Abb. 22D). Die Behandlung mit Ade führte auch in den PRDX1<sup>C52S</sup> exprimierenden Zellen zu der Verzögerung der Einlagerung von Vinculin an den Fokaladhäsionen. Nach der Behandlung mit Ade benötigten die PRDX1<sup>C52S</sup> exprimierenden Zellen zwischen 20 min und 50 min um entsprechende Mengen an Vinculin an den Fokaladhäsionen zu lokalisieren, wobei davon etwa 50% 30 min benötigten (Abb. 22D). Die Expression der PRDX1<sup>C83S</sup> Mutante in Ln229 Zellen führte auch ohne Ade Behandlung zu

einem ähnlichen Verlauf wie die Behandlung mit Ade in den anderen Zellen, sodass die Behandlung mit Ade der PRDX1<sup>C83S</sup> keine Auswirkung auf die Ab- und Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen hatte (Abb. 22E und F). Die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen zeigten mit und ohne Ade Behandlung eine Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen im Zeitraum von 20 min bis 50 min. Die PRDX1<sup>C173S</sup> exprimierenden Zellen zeigten nach der Behandlung mit Ade ähnlich zu den PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen deutliche Unterschiede in der Dynamik der Ab- und Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen. Die Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen war für die mit Ade behandelten Zellen an den früheren Zeitpunkten reduziert; es war eine Reduktion um 15% für den 20 min Zeitwert zu erkennen. Nach 60 min waren in den Ade behandelten Zellen 30% mehr Fokaladhäsionen noch mit Vinculin angereichert als in den Kontrollzellen (Abb. 22G). Bei der Anreicherung von Vinculin an den Fokaladhäsionen konnte für die PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen ebenfalls ein deutlicher Unterschied in dem zeitlichen Ablauf beobachtet werden. Wie schon die PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen war auch für die PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen zu sehen, dass in den ersten 20 min über 90% der Fokaladhäsionen Vinculin anreicherten (Abb. 22H). Diese Anreicherung von Vinculin wurde durch die Behandlung mit Ade so verschoben, dass 90% der Vinculinakkumulation an den Fokaladhäsionen zwischen 20 min und 40 min erfolgte (Abb. 22H).



**Abb. 22 Analyse der Ab- und Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen der Ln229 Gliomzellen.** (A) Abnahme und (B) Zunahme von Vinculin an Fokaladhäsionen von Ln229 PRDX1<sup>WT</sup> Zellen im Vergleich zu Ade behandelten PRDX1<sup>WT</sup> Zellen. (C) Abnahme und (D) Zunahme von Vinculin an Fokaladhäsionen von Ln229 PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen im Vergleich zu Ade behandelten PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen. (E) Abnahme und (F) Zunahme von Vinculin an Fokaladhäsionen von Ln229 PRDX1<sup>C83S</sup> Zellen im Vergleich zu Ade behandelten PRDX1<sup>C83S</sup> Zellen. (G) Abnahme und (H) Zunahme von Vinculin an Fokaladhäsionen von Ln229 PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen im Vergleich zu Ade behandelten PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht p = 0.05, \*\* entsprechen p = 0.01 und \*\*\* entsprechen p = 0.001 hatte. Schwarz – Kontrolle; Blau – Ade Behandlung

Auf Grund der positiven Ergebnisse, die durch die Inhibition von PRDX1 mit Ade erzielt werden konnte, wurden weitere Versuche durchgeführt, um das Potential von Ade als möglichen Therapieansatz für Gliome zu testen. Hierzu wurden neben der Neurotoxizität auch die Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit getestet, da häufig potentiellen Therapeutika das Gehirn nicht erreichen, sondern von der Blut-Hirn-Schranke sofort wieder abtransportiert werden [318]. Die Analyse der Neurotoxizität wurde mit primären Neuronen des Cerebellums adulter Mäusen durchgeführt. Nach einer Adhärenzzeit von 24 Stunden wurden die Neurone mit 4  $\mu$ M Ade behandelt und anschließend ein *CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* durchgeführt. Die Viabilität stieg nach der Ade Behandlung der Neurone im Vergleich zu der DMSO Kontrolle an (Abb. 23A). Der morphologische Vergleich der Neurone zeigte keinen Unterschied zwischen unbehandelten Neuronen und den Neuronen, die entweder mit DMSO oder mit Ade behandelt wurden (Abb. 23A). Zusätzlich wurde der Einfluss von Ade auf die Viabilität von hCMEC/D3 Epithelzellen der humanen Blut-Hirn-Schranke in Kooperation mit Dr. Petja Djurova (AG von Prof. Dr. Gert Fricker, Universität Heidelberg) untersucht, da diese in dieser Arbeit zur Analyse der Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit verwendet wurden. Ade zeigte keine zytotoxische Wirkung auf die hCMEC/D3 Zellen (Abb. 23B). Ebenfalls in Kooperation mit Dr. Petia Djurova wurde über einen Calcein basierenden Versuch [319] die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der Ade durch membranständige Transporterproteine in den Zellen der Blut-Hirn-Schranke zurück in den Blutkreislauf abgegeben wird. Hierbei wurden die Zellen mit dem Acetoxymethylester von Calcein (Calcein-AM) und dem Ade behandelt. Das Calcein-AM wird intrazellulär zu fluoreszierendem Calcein metabolisiert, welches nur über ATP Bindungskassetten (ABC) Transporter der Zellmembran aus den Zellen aus geschleust werden kann. Werden diese Rezeptoren jedoch für den Transport von andern Substanzen beansprucht, sammelt sich das fluoreszierende Calcein intrazellulär. Dementsprechend weist eine stärkere Fluoreszenz bei 515 nm auf einen erhöhten Abtransport von anderen Substanzen hin. Als Kontrollexperiment wurde Cyclosporin C verwendet, welches bedingt durch die hohe Affinität der P-gp Transporter die Blut-Hirn-Schranke nicht passieren kann. Der ermittelte P-gp Wert für Cyclosporin betrug 0.86. Ade war mit einem Wert von 5.45 zwar weniger affin für die ABC Transporter der Blut-Hirn-Schranke als Cyclosporin C (Abb. 23C), jedoch weist dieser Wert darauf hin, dass keine ausreichenden Menge von Ade die Blut-Hirn-Schranke passieren kann, um einen Effekt im Gehirn auszulösen.



**Abb. 23 Zytotoxizitätsuntersuchung von Ade auf Zellen des ZNS und der Kapazität die Blut-Hirn-Schranke zu überqueren.** (A) Untersuchung der Neurotoxizität von Ade an Hand von primären Neuronen des Cerebellums von C57BL/6 Mäusen basierend auf einem MTT Assay, sowie die Analyse der Morphologie. (B) Analyse des Einflusses von Ade auf die Viabilität humaner Epithelzellen aus der Blut-Hirn-Schranke. (C) Untersuchung der Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit von Ade basierend auf dem Calcein-AM Versuchs. Die statistische Auswertung wurde mit einem zwei Stichproben-t-Test durchgeführt, dessen Signifikanzniveaus als Grundlage \* entspricht  $p = 0.05$ , \*\* entsprechen  $p = 0.01$  und \*\*\* entsprechen  $p = 0.001$  hatte.

### 6. Diskussion

Gliome stellen mit 80% der malignen Gehirntumore und ihrem infiltrierenden Wachstum noch immer eine therapeutische Herausforderung dar [5-7]. Der Bedarf an neuen Therapieansätzen ist groß, da die bisher etablierten Therapieformen das Überleben von Glioblastompatienten durchschnittlich um 3 Monate verlängern [172]. Der Verlust des Chromosomenarms 1p wirkt sich positiv auf das Überleben der Patienten aus [9, 92], im Gegenzug führt die Polysomie der Chromosomenarme 1p und 19q in Gliomen zu einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten [320, 321]. PRDX1 wurde als prognostischer und funktioneller Marker identifiziert, der auf dem Chromosomenarm 1p codiert ist [97, 101]. PRDX1 wurde schon in anderen Krebsarten als prognostischer Marker beschrieben. So beeinflusst die erhöhte Expression von PRDX1 in Bauchspeicheldrüsenkrebs [322], Prostatakrebs [323], Lungenkrebs [324, 325] und Plattenepithelkarzinomen [326] die Prognose betroffener Patienten negativ. Zusammengefasst, dass in Gliomen häufig der PRDX1 tragende Chromosomenarm deletiert ist und PRDX1 in anderen Krebsformen als prognostischer Marker identifiziert wurde, macht PRDX1 zu einem höchst interessanten Ansatz zur Behandlung von Gliomen ohne Deletion des Chromosomenarm 1p. Unter diesem Gesichtspunkt wurde in dieser Arbeit der Einfluss von PRDX1 auf Gliomzellen untersucht. Frühere Arbeiten erhärteten die Hypothese, dass PRDX1 maßgeblich an dem positiven Einfluss des LOH 1p/19q in Oligodendrogliomen beteiligt ist [92, 97, 101]. Es konnte bereits gezeigt werden, dass der Verlust von PRDX1 die Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum TMZ steigert [101], jedoch wurde die Untersuchung des Einflusses von PRDX1 auf die Motilität und Migrationsfähigkeit von Gliomzellen bislang nicht untersucht. Die Infiltration der Gliomzellen in das Gehirngewebe stellt jedoch noch immer das Hauptproblem in der Behandlung von Gliomen dar, sodass diese Beantwortung der Fragestellung, wie PRDX1 die Migration von Gliomzellen beeinflusst, äußerst wertvolle und vielversprechende Informationen für mögliche neue Therapieansätze liefern kann.

#### 6.1 Modulation der Genexpression in Gliomzellen

Die Expression von PRDX1 und p38 MAPK wurde in den Gliomzellen über das Einbringen von spezifischen shRNAs oder des Gens moduliert. Hierzu wurde ein lentivirales Vektorsystem verwendet, das die DNA Sequenzen stabil in das Genom der Gliomzellen integriert. Der Vorteil von Lentiviren ist im Vergleich zu anderen Viren, dass sie sowohl proliferierende als auch nicht proliferierende humane Zellen infizieren können und durch die stabile Integration der DNA in das zelluläre Genom die eingebrachten DNA Konstrukte längerfristig exprimiert werden [327]. Durch die Einführung der Replikationsinkompetenz

wurde die Sicherheit in der Anwendung der Viren erhöht [328, 329]. Adenoviren zum Beispiel bieten zwar mit 8 kb ebenso wie die Lentiviren mit 9 kb [330] ausreichend Platz für DNA Sequenzen, die in die Wirtszelle eingebracht werden sollen, können jedoch nur nicht proliferierende Zellen infizieren und integrieren die DNA Sequenz nicht in das Wirtsgenom, sodass keine dauerhafte Expression möglich ist [331, 332]. Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Konstrukte sind mit 9 kb für die PRDX1 modulierenden Konstrukte sowie 7 kb für das shRNA Konstrukt gegen *MAPK14* mRNA sehr groß, sodass sich Lentiviren durch ihre Aufnahmekapazität sehr gut eignen. Für die Reduktion der Expression von Genen wird die RNA-Interferenz genutzt. Dies ist ein in eukaryotischen Zellen konservierter Mechanismus um die Genexpression über den mRNA Abbau durch Mikro-RNAs (miRNAs) zu regulieren [333-335]. Für die Nutzung der RNA-Interferenz über virale Systeme werden entweder siRNAs oder shRNAs eingebracht. Die shRNAs haben gegenüber den siRNAs den Vorteil, dass sie stabil mit einem konstitutiv aktiven Polymerase II Promotor wie dem U6 Promotor [336] integriert und so dauerhaft exprimiert werden [337-339]. Die 21-23 nt langen siRNAs können zum einen direkt eingebracht werden [340, 341] oder werden transient exprimiert, da sie nicht integriert werden können [342-344]. In dieser Arbeit wurde das stabil integrierende shRNA System verwendet, welches in den Hs683 Zellen, den Ln229 Zellen und den NCH612 Zellen die Expression von PRDX1 auf mRNA- und Proteinebene deutlich reduzierte (Abb. 4A-B und D-G). Die anderen *PRDX* Varianten zeigten keine signifikante Veränderung der mRNA Menge in Hs683 Zellen nach der Reduktion der PRDX1 Expression, außer *PRDX6*, dem einzigen 1-Cys PRDX (Abb. 4C). Erwartungsgemäß wäre jedoch am ehesten die Kompensation des PRDX1 Verlustes durch PRDX2, da dieses die höchste Homologie zu PRDX1 aufweist [153]. PRDX6 hat im Vergleich zu PRDX1 keine Chaperonfunktion, welche im Folgenden jedoch eine essentielle Rolle aufweist, sodass die erhöhte Expression von *PRDX6* auf mRNA Ebene eine untergeordnete Rolle spielt und vernachlässigbar für diese Arbeit ist. Die Reduktion von p38 MAPK war ebenfalls signifikant auf Protein- und mRNA Ebene (Abb. 6A, F, H und M). Als Kontrolle wurde eine shRNA verwendet, die keine Zielsequenz in den humanen Gliomen hat. Dies ermöglicht den Ausschluss, dass die beobachteten Effekte von dem Einbringen einer shRNA oder der viralen Infektion verursacht werden. Die NCH1681 Zellen exprimieren endogen kein PRDX1, sodass hier die Expression wieder hergestellt werden musste. Das *PRDX1* Gen wurde unter der Kontrolle von einem CMV Promotor [345] über Lentiviren in die Zellen eingebracht. Dies führte auf mRNA und Proteinebene zu einer deutlich erhöhten Expression von PRDX1 (Abb. 4H-I). Als Kontrolle wurde das *GFP* Gen eingebracht. Der Nachteil an viral eingebrachten DNA Sequenzen zeigte sich an den kombinierten Konstrukten in denen das endogene PRDX1 reduziert und verschiedene PRDX1 Varianten exprimiert werden. Es zeigte sich sowohl in den Ln229 Zellen als auch in den Hs683 Zellen, dass die Reduktions- und die Überexpressionslevel auf

mRNA Ebene ungleich waren (Abb. 19A und C). Das Einbringen von shRNAs oder Genen über Viren birgt immer das Risiko, dass die Expressionslevel schwanken. Die Verwendung eines stabileren Systems wie das CRISPR/Cas Systems [346] würde dies eventuell umgehen und die Abweichungen in den Versuchen weiter reduzieren. Die Kapazität des CRISPR/Cas System wäre vor allem für die Konstrukte, die das endogene PRDX1 reduzieren und im Gegenzug die mutierten Varianten einbringen, nicht ausreichend, da diese Konstrukte sowohl die shRNA für endogenes PRDX1 als auch das mutierte Gen für PRDX1 mit den jeweiligen Promotoren kodieren muss. Aus diesem Grund eigneten sich der auf Lentiviren basierende Ansatz besser, um die Fragestellung dieser Arbeit zu untersuchen.

### **6.2 Untersuchung niedergradiger Gliomzellen im Hinblick auf den LOH 1p/19q**

Die Analyse der PRDX1 Expression in niedergradigen Gliomzellen gibt einen Hinweis darauf, ob ein Verlust des Chromosomenarms 1p vorliegen könnte. Die in dieser Arbeit verwendeten niedergradigen Gliomzellen, NCH612 und NCH1681, zeigten Unterschiede in der Expression von PRDX1 auf mRNA und Proteinebene. Die NCH612 Zellen exprimierten PRDX1, während in den NCH1681 Zellen weder in der Analyse der mRNA Mengen noch auf Proteinebene PRDX1 detektiert werden konnte (Abb. 4H-I). Der Genlokus von *PRDX1* konnte in einer früheren Studie dem minimal deletierten Bereich des Chromosomenarms 1p im LOH 1p/19q zugeordnet werden [97]. Die qPCR Analyse [347, 348] der *PRDX1* Allele im Vergleich zu dem monoallelischen *IGF1* Gen bestätigte den Verlust eines *PRDX1* Allels in den NCH1681 Zellen. Dies und die Ergebnisse der mRNA- und Proteineanalyse weisen darauf hin, dass die NCH1681 Zellen zumindest einen Teilverlust des Chromosomenarms 1p tragen, sodass die Expression von PRDX1 verloren gegangen ist. Jedoch wären für die sichere Identifikation eines LOH 1p oder LOH 1p/19q weitere Untersuchungen notwendig. Zu nächst wäre die Analyse Cytosin Methylierung der CpG Inseln der Chromosomenarmen 1p und 19q essentiell, da die verbliebenen Chromosomenarme bei einem LOH eine Hypermethylierung der Promotorregionen aufweisen [101]. Weitere Nachweismethoden um einen LOH 1p bzw LOH 1p/19q zu identifizieren sind zum Beispiel die Mikrosatelliten PCR [347, 349], der *FISH*-Test (*Fluorescence in situ hybridization*) [350] oder die vergleichende genomische Hybridisierungsanalyse (CGH) [351]. Der Fokus dieser Arbeit lag jedoch auf der Expression von PRDX1 unabhängig ob die Expression durch einen LOH 1p oder LOH 1p/19q verloren ging. Dementsprechend wurde die Analyse lediglich auf die Expression von PRDX1 beschränkt.

### **6.3 Der Verlust von PRDX1 erhöht die Sensitivität gegenüber TMZ**

Die Reduktion der PRDX1 Expression in den Hs683 Gliomzellen erhöhte die Sensitivität gegenüber TMZ, sodass die Anzahl lebendiger Zellen nach der Behandlung mit 400 µM TMZ



im Vergleich zu den Kontrollzellen signifikant reduziert war (Abb. 5A hellblaue Balken). Diese Ergebnisse bestätigen die frühere Studie von L. Dittmann und Kollegen, die PRDX1 erstmals als funktionellen Marker in Gliomen identifizierten [101]. Die Inhibition von PRDX1 untermauert den Einfluss von PRDX1 auf die Sensitivität gegen TMZ ebenfalls. Durch die Behandlung mit Ade und TMZ reichten schon 100  $\mu$ M TMZ aus, um die Viabilität der Hs683 Kontrollzellen signifikant zu reduzieren (Abb. 5A hellblau gestreifte Balken). Da PRDX1 durch seine Peroxidaseaktivität an dem Abbau von ROS beteiligt ist, wurde die Formation von ROS als Mechanismus über den TMZ die Apoptose der Gliomzellen induziert beschrieben [352]. Die Synthese von ROS durch alkylierende Chemotherapeutika wurde zuvor in HeLa Zellen beschrieben [353] und konnte für TMZ in Gliomzellen bestätigt werden [352]. Jedoch konnte für TMZ der genaue Mechanismus wie ROS produziert werden noch nicht identifiziert werden. Als mögliche Wege wären ähnlich wie bei anderen alkylierenden Chemotherapeutika wie Methylnitronitrosoguanidine (MNNG) oder Duocarmycin die Generation von ROS über Poly(ADP-ribose)-Polymerase 1 (PARP-1) oder NADH Dehydrogenase [353, 354]. In jeden Fall ist der Anstieg von ROS häufig ein Apoptose induzierendes Signal, wie zum Beispiel in Brustkrebs [355, 356], Eierstockkrebs [357] oder Fibrosarkomen [358]. Es wurde beschrieben, dass ROS die Apoptose über Mutationen der DNA als auch über den Zellzyklusarrest induziert [359, 360]. Der Zellzyklusarrest tritt meistens in G1, S oder G2 auf [361-363] und wird maßgeblich über Inhibition der *Cell division control* (Cdc) Proteine gesteuert wie zum Beispiel die Inhibition von Cdc2 über p21 [364-366]. Des Weiteren führt der enorme Anstieg von ROS zu der Zunahme des pro-apoptotischen Proteins *Bcl-2-associated X Protein* (Bax) und der Abnahme des anti-apoptotischen Proteins *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2) [367]. Eine weitere Studie konnte zusätzlich die durch ROS gesteuerte Inhibition der Telomerase zeigen [368]. Betrachtet man diese Studien zusammen, scheint die Hypothese wahrscheinlich, dass die in Gliomen beobachtete Apoptose nach der Behandlung von TMZ durch die Entstehung von ROS induziert sein könnte. Verstärkt wird diese Annahme dadurch, dass PRDX1 exprimierende Zellen resistent gegen TMZ zu sein scheinen und der Verlust von PRDX1 die Zellen sensitiv gegenüber TMZ macht.

**6.4 Die Proliferation von Gliomzellen scheint ein PRDX1 unabhängiger Prozess zu sein**

PRDX1 wurde auf Grund von dessen antioxidativer Peroxidasefunktion häufig mit der Regulation der Proliferation und Apoptose von Säugetierzellen in Zusammenhang gebracht. Wie oben beschrieben, erhöht der Verlust von PRDX1 die intrazellulären ROS Mengen und aktiviert zum Beispiel über die Inaktivierung von Cdc2 die Apoptose [366]. Weitere Studien konnten zeigen, dass PRDX1 die Proliferation humaner Zellen wie die Promyelozytenzellen HL60 steigern kann [150]. Ebenso beobachteten J.R. Riddell und Kollegen, dass der Verlust

von PRDX1 in Prostatakrebs zu einer reduzierten Tumorgroße im Vergleich zu PRDX1 exprimierenden Tumoren führt und dass die Zugabe von rekombinantem PRDX1 *in vitro* die Proliferation steigert [323]. In dieser Arbeit wurde die Proliferation auf drei unterschiedliche Weisen untersucht, die verschiedene Ergebnisse zeigten. Werden die Zellen in Petrischalen kultiviert und die Anzahl der Zellen nach festgelegten Zeitpunkten bestimmt, zeigt der Verlust von PRDX1 eine Reduktion der Zellproliferation (Abb. 5C). Die Analyse der Zellproliferation mittels Impedanzmessung mit dem RTCA DP System (Abb. 5B) oder während dem Wachstum als Tumorsphären zeigte keinen Unterschied der Proliferation zwischen PRDX1<sup>KD</sup> und Kontrollzellen (Abb. 5D-E). Bei der Proliferationsanalyse mittels Zellzahlbestimmung wurde im Gegensatz zu den anderen Untersuchungen nicht zwischen lebenden und apoptotischen Zellen unterschieden. Die Messung mittels Impedanz schließt die apoptotischen Zellen zum großen Teil aus, da diese rundlich und weniger adhäsiv sind. Der reduzierte Durchmesser und die geringere Adhäsion der Zellen führt zu einem niedrigeren Wert in der Impedanzmessung, sodass davon auszugehen ist, dass die apoptotischen Zellen einen minimalen Einfluss auf die Messwerte haben. Bei der Quantifizierung der Tumorsphären wurden apoptotische Zellen durch die Färbung mit Trypanblau identifiziert. Die Zellanzahl ebenso wie die Apoptose zeigten, möglicherweise durch die Tatsache, dass in dem Wachstum als drei dimensionale Sphäre die interzellulären Kontakte einen höheren Stellenwert haben, keine signifikanten Unterschiede.

Zusammengenommen mit der Viabilitätsanalyse scheint PRDX1 die Proliferation sowie die Viabilität von Hs683 Zellen nicht zu beeinflussen. Die Studie von L. Dittmann und Kollegen bestätigte ebenfalls, dass der Verlust von PRDX1 in Hs683 Zellen ohne die Behandlung mit TMZ keinen Einfluss auf die Viabilität und die Apoptose von Hs683 Gliomzellen hat [101]. Jedoch bleibt unter dieser Annahme die Frage offen, wie die verbesserte Prognose unabhängig von der Therapie mit TMZ entsteht [92]. Dementsprechend bedarf dies weiterer Untersuchungen.

### **6.5 PRDX1 reguliert die Migration und Infiltration der Gliomzellen über die Aktivierung von p38 MAPK**

#### **6.5.1 PRDX1 reguliert die Aktivität von p38 MAPK**

Die Regulation der p38 MAPK Aktivität durch PRDX1 wurde schon in früheren Studien beobachtet, wobei hier kontroverse Ergebnisse erzielt wurden. Eine Studie zeigte, dass PRDX1 unter oxidativem Stress die Phosphorylierung von p38 MAPK in Brustkrebszellen über MKP-5 hemmt [167]. PRDX1 bindet als Dimer MKP-5 und verhindert so dessen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzierte Inaktivierung, sodass p38 MAPK weiterhin durch MKP-5 inaktiviert wird. Des Weiteren wurde in zwei Studien die Interaktion von

PRDX1 und ASK1 beobachtet. ASK1 ist ein positiver Regulator der p38 MAPK Aktivierung [369]. R.M. Jarvis und Kollegen konnten zeigen, dass der Verlust von PRDX1 in U937 Lymphomzellen unter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Behandlung zu einer Reduktion von phosphoryliertem p38 MAPK führt [165]. Eine andere Studie zeigte jedoch, dass ASK1 in HEK293T Zellen an PRDX1 bindet und so die Inhibition durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verhindert wird [166]. Dem zu Folge, wurde für die Interaktion von ASK1 und PRDX1 zum einen ein aktivierender und zum anderen ein inhibierender Charakter beschrieben. Eine weitere Studie konnte eine direkte Interaktion mit PRDX1 und p38 MAPK in Bauchspeicheldrüsenkrebs unabhängig von oxidativem Stress nachweisen [370]. Die Untersuchung von Gliomzellen im Hinblick auf die Phosphorylierung von p38 MAPK wurde in dieser Arbeit mittels Proteinanalyse durchgeführt. Die Reduktion der PRDX1 Expression in Hs683 und Ln229 Gliomzellen zeigte eine deutliche Verminderung der Phosphorylierung von p38 MAPK im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollzellen (Abb. 6A und H). Die Kontrollversuche bestätigten diese Ergebnisse, sowohl die Reduktion der p38 MAPK Menge als auch dessen Inhibition durch SB203580 wiesen reduzierte p-p38 MAPK Level auf (Abb. 6A-C und H-J), während die Aktivierung von p38 MAPK durch Anisomycin die Phosphorylierung erhöht (Abb. 6B, C, I und J). Die Reduktion von p38 MAPK führte zusätzlich zu dem Verlust von PRDX1 auf Proteinebene sowohl in Hs683 Zellen als auch in Ln229 Zellen (Abb. 6A und H). Neben der Analyse der Proteinmengen wurden die mRNA Level von *PRDX1* und *MAPK14* (p38 MAPK) bestimmt. Die Reduktion von PRDX1 war in beiden Zelllinien signifikant, führte jedoch in den Hs683 Zellen zu der Erhöhung von *MAPK14* (p38 MAPK) Transkripten um etwa 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 6F und M). Diese Erhöhung wirkte sich jedoch nicht auf die Proteinmenge aus. Die Reduktion von p38 MAPK konnte ebenfalls in der Transkriptmenge nachgewiesen werden, jedoch konnte sowohl in den Hs683 Zellen als auch in den Ln229 Zellen eine deutliche Reduktion der *PRDX1* mRNA beobachtet werden (Abb. 6F und M). Die Reduktion von PRDX1 auf Protein und mRNA Ebene kann natürlich von einer unspezifischen Bindung der shRNA gegen *MAPK14* (p38 MAPK) herrühren. Jedoch gab die Sequenzanalyse mittels NCBI BLAST ([www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)) hierfür keinen Anhalt. Frühere Studien zeigten, dass die PRDX1 Menge durch die Regulation von Transkription, Translation und Proteinabbau moduliert werden kann. Die Promotorregion von *PRDX1* enthält eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor *Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-like 2* (Nrf2), durch dessen Bindung wird die Transkription von *PRDX1* erhöht [147, 148, 371]. Nrf2 hingegen wird zum Beispiel durch p38 MAPK aktiviert [372, 373], sodass angenommen werden kann, dass p38 MAPK die Transkription von *PRDX1* über Nrf2

positiv beeinflusst. Des Weiteren kann die Stabilität der *PRDX1* mRNA durch MAPKAPK2 reguliert werden. MAPKAPK2 erhöht die Stabilität von mRNA Molekülen, die ein ARE Motiv tragen, wie zum Beispiel die mRNA von *PRDX1* [374, 375]. Die Menge von MAPKAPK2 wurde in Folge von der Reduktion von *PRDX1* oder p38 MAPK auf Proteinebene in Hs683 und Ln229 Zellen reduziert (Abb. 6D und K). Dem zu Folge könnte *PRDX1* durch den Verlust von p38 MAPK zum einen auf Transkriptionsebene durch die Regulation mittels Nrf2 oder aber auch durch den Verlust von MAPKAPK2 auf mRNA Ebene reguliert werden. Zusätzlich wurde *PRDX1* als Ziel der Ubiquitin-Protein-Ligase E6-AP identifiziert [376, 377]. E6-AP markiert Proteine mit einem Ubiquitinrest, sodass diese von Proteasomen erkannt und abgebaut werden. E6-AP ist ein Zielprotein des chromosomalen *Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1* (c-Abl), das E6-AP inhibiert [378]. Durch die Inhibition von E6-AP sollte der Abbau von *PRDX1* reduziert werden. *PRDX1* hingegen inhibiert c-Abl [379], sodass eine negative Rückkopplung denkbar wäre. Neben der Inhibition von E6-AP führt c-Abl zu einer Aktivierung von p38 MAPK [380]. Der Mechanismus, der der Regulation von *PRDX1* in Abhängigkeit von p38 MAPK zu Grunde liegt, muss jedoch in weiteren Studien noch genauer untersucht werden. Für die vorliegende Arbeit ist die Regulation von *PRDX1* durch p38 MAPK jedoch irrelevant, da p38 MAPK in der Signalkaskade nach *PRDX1* steht und die Reduktion von p38 MAPK eine Kontrolle der Signalkaskade unterhalb von *PRDX1* ist.

Die Immunfluoreszenzfärbung der auf Poly-L-Lysin beschichteten Deckgläsern gewachsenen Zellen zeigte eine Co-Lokalisation von *PRDX1* und p38 MAPK bzw. p-p38 MAPK in den Zellfortsätzen (Abb. 6E und L). Der Verlust von *PRDX1* führt zu der Reduktion der p-p38 MAPK Färbung und der Umverteilung von p38 MAPK weg von den Zellausläufern. Ähnliche Ergebnisse konnten in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen beobachtet werden [370] und verstärken die Hypothese, dass die Regulation von p38 MAPK von *PRDX1* abhängig ist.

### 6.5.2 Die Morphologie der Gliomzellen ist abhängig von der *PRDX1* gesteuerten Aktivierung von p38 MAPK

Die Kontrollzellen der Hs683 und Ln229 Zellen zeigten in der Phalloidininfärbung eine gespreitete Morphologie mit Zellfortsätzen wie zum Beispiel Lammellipodien oder Filopodien (Abb. 15A und E). Die Reduktion von *PRDX1*, p38 MAPK oder beider Proteine führte zu einer abgerundeten Morphologie, bei der die Actinfilamente hauptsächlich um den Nukleus lokalisiert sind. Actinfilamente sind essentiell für die Motilität der Zellen [204]. Parallel angeordnete oder vernetzte Actinfilamente sind für die Ausbildung von Zellfortsätzen notwendig [199, 200], die neue Verbindungen über

Fokaladhäsionen mit der Umgebung ausbilden [192]. Die gegenläufig angeordneten und mit Myosin-Mikrotubuli assoziierten Stressfasern sind wichtig, um das hintere Ende der Zellen nach zu ziehen [203]. Die Ln229 und Hs683 Kontrollzellen bildeten sowohl Stressfasern als auch Zellfortsätze aus, während die PRDX1<sup>KD</sup>, p38<sup>KD</sup> und PRDX1<sup>KD</sup>+p38<sup>KD</sup> rund erschienen und die Actinfilamente um den Nukleus konzentriert waren. In Bauchspeicheldrüsenkrebszellen führte die Reduktion von PRDX1 zu dem Verlust von Actin in den peripheren Strukturen wie zum Beispiel Lammellipodien [370]. Weitere Studien konnten ebenfalls zeigen, dass Leukämie- und Brustkrebszellen durch den Verlust von PRDX1 ebenfalls kleiner waren als die Kontrollzellen [311, 381]. Die Regulation des Actin Zytoskeletts durch p38 MAPK wurde in mehreren Studien beschrieben [382], sodass der Einfluss des p38 MAPK Verlusts auf die Zellmorphologie und die Anordnung des Actin Zytoskeletts zu erwarten war. Die Regulation von p38 MAPK scheint in Gliomzellen abhängig von PRDX1 zu sein. Diese Hypothese wird durch die Beobachtung, dass die Inhibition von p38 MAPK in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen keinen weiteren Effekt hatte, während die Aktivierung von p38 MAPK lediglich in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen den gespreiteten Phänotyp wieder herstellen konnte (Abb. 15D und H). Die Inhibition von p38 MAPK in Kontrollzellen hatte den selben Effekt wie der Verlust von PRDX1 oder p38 MAPK. In migrierenden Gliomzellen konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass die Actinfilamente hauptsächlich an den Zellausläufern lokalisiert ist [201]. Dementsprechend scheint PRDX1 und p38 MAPK ein wichtiger Regulator des Actin Zytoskeletts zu sein, dessen Verlust die Formation und Anordnung von Actinfilamenten verändert.

### 6.5.3 PRDX1 reguliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen in Abhängigkeit von p38 MAPK und beeinflusst die Migration der Gliomzellen

Die Zellmigration unterliegt einer komplexen Regulation des Actin Zytoskeletts und der Adhäsion an den umliegenden Strukturen. Während der Migration werden zunächst Zellfortsätze ausgebildet, die über Fokaladhäsionen adhären und anschließend muss das hintere Ende der Zelle nach gezogen und die Fokaladhäsionen gelöst werden [192]. Dementsprechend führt der Verlust von Zellfortsätzen wie Filopodien zu einer reduzierten Migration der Zellen [201]. Die Ausbildung von Filopodien konnte zum Beispiel durch den Verlust von Fokaladhäsionen in C6 Gliomzellen reduziert werden [229]. Die Regulation der Dynamik der Fokaladhäsionen und Actinfilamente sind abhängig von einander, da die Fokaladhäsionen über Vinculin als Anker für die Actinfilamente dienen [261]. Aus diesem Grund wurde für die Analyse der Fokaladhäsionen in dieser Arbeit ein

fluoreszenzmarkiertes Vinculinkonstrukt verwendet. Des Weiteren wurde bereits der Zusammenhang von Actinfilamenten und Fokaladhäsionen in Gliomzellen beschrieben. Die Reduktion der Fokaladhäsionsformation führt in U251 Gliomzellen zu einem Verlust der Actinfilamenten und reduziert die Migration der Zellen [252]. Die Rolle von Fokaladhäsionen während der Migration wurde bisher kontrovers diskutiert. Einige Studien zeigten, dass kleinere Fokaladhäsionen die Bildung von Zellfortsätzen steigert und dass größere Fokaladhäsionen am hinteren Ende der Zelle lokalisiert sind und zu einer Reduktion der Zellfortsätze führt [254, 255, 383]. Andererseits konnten weitere Studien zeigen, dass Fokaladhäsionen an der Vorderseite der Zelle lokalisiert sein müssen und die Migration zu fördern [253, 255, 260, 384, 385]. Die Studie von D.H. Kim und Kollegen vereinte diese Kontroversen, indem sie den biphasischen Einfluss von Fokaladhäsionen auf die Migration von Zellen beschrieben. Der Zuwachs der Fokaladhäsionsgröße auf bis zu  $2.6 \mu\text{m}^2$  in embryonalen Mausfibroblasten (MEFs) führt zu einer gesteigerten Migration, während weiterer Größenzuwachs die Migration inhibiert [386]. Der dynamische Umbau von Actinfilamenten und Fokaladhäsionen muss einen Gleichgewicht zwischen Ab- und Aufbau unterliegen, um die Migration der Zellen zu ermöglichen. Ist das Gleichgewicht gestört durch zum Beispiel eine enorme Überexpression oder dem Verlust von Cofilin wird die Migration gehemmt [221, 222], während eine moderate Überexpression die Migration in Gliomzellen erhöhen kann [219, 220]. Ähnlich verhält sich der Einfluss des Fokaladhäsionsumbaus, die Überexpression bzw. die Reduktion von PTP-PEST inhibiert die Zellmigration [243, 244].

In Gliomzellen konnte *in vivo* in einem Xenograft Mausmodell gezeigt werden, dass die Ausbildung von Zellfortsätzen nicht nur für die interzelluläre Kommunikation sondern auch für die Migration notwendig ist sondern auch die Ausbildung dieser in Oligodendrogliomzellen, die einen LOH 1p/19q tragen, reduziert ist [387]. Der Verlust von PRDX1 reduzierte die Dynamik der Fokaladhäsionen (Abb. 17) und der Actinfilamente (Abb. 16B und I) in den Ln229 und Hs683 Gliomzellen. Die Fokaladhäsionen zeigten eine Reduktion der Längenänderung (Abb. 17B und F) sowie eine verlangsamte Abnahme und die Zunahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen (Abb. 17C-D und G-H). Ähnlich war der Einfluss der Reduktion von p38 MAPK auf die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen (Abb. 16 und 17 grüne Balken). Der doppelte Verlust von p38 MAPK und PRDX1 konnte nur im Hinblick auf die Fokaladhäsionen analysiert werden, da diese Zellen keine quantifizierbaren Actinfilamente aufwiesen (Abb. 16A und H). Die Untersuchung der Fokaladhäsionen zeigte ebenfalls einen verminderten Umsatz von Fokaladhäsionen ähnlich wie der Verlust von PRDX1 und p38 MAPK (Abb. 17 weiße Balken).

Entsprechend der bisher durchgeführten Studien, bildeten die Hs683 und die Ln229 Gliomzellen mit einer geringeren Dynamik des Actinzytoskeletts und der Fokaladhäsionen weniger Zellfortsätze aus (Abb. 16E und L). In Astrozytomen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass migrierende Zellen einen erhöhten Umbau von Fokaladhäsionen aufweisen im Vergleich zu nicht migrierenden Zellen [388]. Die Inhibition von p38 MAPK durch SB203580, welches die Bindungsstelle für ATP an p38 MAPK blockiert, reduziert die Actindynamik in Hs683 und Ln229 Kontrollzellen (Abb. 16C und J). Die Ausbildung von Zellfortsätzen wurde durch die Behandlung mit SB203580 ebenfalls reduziert (Abb. 16F und M). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit SB203580 führte in keiner der beiden Zelllinien zu einer weiteren Reduktion der Actindynamik oder der Ausbildung von Zellfortsätzen (Abb. 16D, G, K und N). Dies impliziert, dass PRDX1 über die Regulation von p38 MAPK das Actin Zytoskelett und die Fokaladhäsionen moduliert. In Bauchspeicheldrüsenkrebszellen konnte bereits gezeigt werden, dass die Interaktion von PRDX1 und p38 MAPK die Migration der Zellen beeinflusst, sodass die Ergebnisse dieser Arbeit dies widerspiegeln konnten. Die Motilität und die Migration wurden in Gliomzellen ebenfalls durch PRDX1 moduliert. Der Verlust von PRDX1 bzw. p38 MAPK reduzierte die Motilität der Gliomzellen im *Scratch Assay*, sodass der Spalt weniger geschlossen wurde als in den Kontrollzellen (Abb. 7A und C). Dabei konnte bei den Hs683 Zellen ein größerer Effekt der p38 MAPK Reduktion als durch die Reduktion von PRDX1 beobachtet werden (Abb. 7A). Die ist möglicherweise auf darauf zurück zuführen, dass die Reduktion von PRDX1 die Phosphorylierung von p38 MAPK nicht vollständig verhindert und der Verlust von p38 MAPK so zu einem größeren Effekt führen kann. In Ln229 Zellen zeigte sich keinen Unterschied zwischen PRDX1<sup>KD</sup> und p38<sup>KD</sup> Zellen. Die Behandlung der Hs683 und der Ln229 Kontrollzellen mit SB203580 reduzierte den Spaltschluss ebenfalls auf das Niveau des p38<sup>KD</sup> (Abb. 7B und D). Die Migration von Gliomzellen wurde in einem *Boyden Chamber* Versuch untersucht. Dabei konnte im Vergleich zu den Kontrollzellen eine Reduktion der Migration in PRDX1<sup>KD</sup> und p38<sup>KD</sup> Zellen beobachtet werden. Die Reduktion von PRDX1 zeigte in den niedergradigen Gliomzellen NCH612 aber auch in den hochgradigen Gliomzellen Ln229 und Hs683 eine reduzierte Migration (Abb. 8A, B und C). Die Wiederherstellung der PRDX1 Expression in NCH1681 Gliomzellen konnte die Migration erhöhen, sodass der Effekt von PRDX1 auf die Migration bestätigt werden konnte (Abb. 8D). Die Reduktion von p38 MAPK verminderte die Anzahl migrierter Zellen der Ln229 und Hs683 Zellen mehr als der PRDX1 Verlust (Abb. 8A und B). Dies kann wie oben für die Motilität beschrieben daran liegen, dass der Verlust von PRDX1 die Phosphorylierung von p38 MAPK nicht vollständig blockiert. Die Inhibition

von p38 MAPK reduzierte in den drei PRDX1 exprimierenden Zelllinien – Ln229, Hs683 und NCH612 – die Migration in ähnlichem Maße wie die Reduktion der Expression von p38 MAPK (Abb. 8E, F und G). Die Behandlung mit SB203580 der PRDX1<sup>KD</sup> Zelllinien zeigte jedoch keine weitere Reduktion der Migration (Abb. 8I, J und K), sodass auch hier davon ausgegangen werden kann, dass PRDX1 die Migration über die Regulation von p38 MAPK moduliert. Der Einfluss von PRDX1 auf die Aktivierung von p38 MAPK und somit auf die Migration wurde für Bauchspeicheldrüsenkrebs und Lymphomzellen bereits gezeigt [165, 370]. Die NCH1681 Zellen, die endogen kein PRDX1 exprimieren, bestätigten den Einfluss von PRDX1 über p38 MAPK ebenfalls. Die Behandlung von PRDX1<sup>Res</sup> Zellen mit SB203580 konnte die durch das Wiedereinbringen von PRDX1 erhöhte Migration wieder reduzieren, während die Kontrollzellen keinen Effekt durch SB203580 zeigten (Abb. 8H und L). Zusammenfassend zeigten diese Versuche, dass PRDX1 in Gliomzellen durch die Stabilisierung der Phosphorylierung von p38 MAPK die Actindynamik und den Umbau von Fokaladhäsionen reguliert und so die Migration steigert.

### 6.5.4 Migration von Gliomzellen in einer drei dimensional Matrix

Die Analyse der Fokaladhäsionen auf zwei dimensional Oberflächen wie Glas oder Kunststoff spiegelt nicht die Situation in einer drei dimensional Umgebung wider. *In vivo* befinden sich die Zellen in einer drei dimensional Matrix, die aus unterschiedlichen Bestandteilen besteht [389]. Einige Studien konnten zeigen, dass Fokaladhäsionen von Zellen in einer drei dimensional Matrix eine reduzierte Form der Fokaladhäsionen, die auf einer zwei dimensional Matrix ausgebildet werden, darstellen [390, 391]. Dabei ändert sich die Zusammensetzung der Fokaladhäsionen kaum, jedoch konnte gezeigt werden, dass zum Beispiel die Phosphorylierung von FAK an Y397 ausschließlich auf zwei dimensional Oberflächen entsteht [392]. Der Einfluss von Vinculin ist allerdings in beiden Fokaladhäsionsarten gleich, so führt der Verlust von Vinculin sowohl in einem zwei bzw. drei dimensional Kontext zu einer reduzierten Migration der Zellen [389-391]. In einer drei dimensional Matrix erscheinen die Fokaladhäsionen eher als eine Akkumulation der entsprechenden Proteine in den Zellfortsätzen anstatt als fest formatierten Komplexen [389].

- Migration durch eine drei dimensionale Matrix *in vitro*

In dieser Arbeit wurde als drei dimensionale Matrix Matrigel verwendet. Die Titration des Matrigels zeigte, dass lediglich die Ln229 Zellen ein 20%iges Matrigel überwinden konnten, während die Hs683 Zellen nur 2.5%iges



Matrigel durchwanderten (Abb. 9). Dies kann zum einen an der erhöhten Migrationsfähigkeit der Ln229 Zellen im Vergleich zu den anderen verwendeten Linien liegen, oder durch die im Matrigel enthaltenen Wachstumsfaktoren gesteuert sein. Da Matrigel ein Zellprodukt ist, enthält es Wachstumsfaktoren die als Chemokine fungieren [393, 394]. Dementsprechend könnte für die Hs683 Zellen der Gradient in höher konzentriertem Matrigel nicht ausreichend gewesen sein, sodass die Zellen nur in das Matrigel aber nicht durch es hindurch gewandert sind. Die Matrigel basierten Versuche wurden dem zu Folge nur mit den Ln229 Zellen durchgeführt. Der Verlust von PRDX1 reduzierte die Anzahl der Zellen, die durch das Matrigel und die Membran wandern konnten um 50% im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 10A). Auch hierbei konnte bei der Reduktion von p38 MAPK eine deutlich stärkere Reduktion der gewanderten Zellen beobachtet werden (Abb. 10A). Dieser Effekt kann, wie bereits in den Motilitäts- und zwei dimensional Migrationsversuchen beschrieben, auf Grund der nicht vollständigen Dephosphorylierung von p38 MAPK nach der Reduktion von PRDX1 entstehen. Die Behandlung von Ln229 Kontrollzellen mit SB203580 verhinderte die Migration der Zellen fast vollständig (Abb. 10B). Diese Ergebnisse konnten durch die Impedanzmessung mit dem RTCA DP System bestätigt werden. Der Vergleich von Kontrollzellen und PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigte einen deutlichen Anstieg des *Cell Index* in den Kontrollzellen auf etwa 1.0, während die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen nur auf 0.1 kamen (Abb. 10C). Die Inhibition von p38 MAPK reduzierte den *Cell index* ebenfalls auf 0.1, während in den Kontrollzellen der *Cell index* auf 1.0 stieg (Abb. 10D). Dies bestätigt den Einfluss von PRDX1 und p38 MAPK auf die Migration von den Gliomzellen.

- Gliomzellen infiltrieren das Gehirngewebe abhängig von der PRDX1 Expression und in Abhängigkeit von der Aktivierung von p38 MAPK

Die Infiltration von Gliomzellen in ihrer natürlichen Matrix wurde auf organotypischen Schnitten des Hippocampus untersucht. Die ECM von Gliomzellen ist das Gehirn, welche sich aus Blutgefäßen, Nervenzellen, Immunzellen und Stützzellen zusammen setzt [395-397]. Hierzu wurde zunächst das Protokoll zur Herstellung von organotypischen Gehirnschnitten [313, 314] und der Tumorsphären etabliert [315]. In dieser Arbeit wurden die Schnitte aus dem Hippocampus angefertigt, da hier eine gerichtete Migration in Richtung CA3 Region zu beobachten war. Dies würde die Hypothese

bekräftigen, dass Gliomzellen auf Myelin wandern. Der Hippocampus enthält viele Faserbündel, die Gliomzellen mitunter als Weg zur Infiltration des Gehirns nutzen können [52, 53]. Die Gliomzellen exprimierten GFP als Marker, sodass die infiltrierten Zellen und die Sphären durch 2-Photonenmikroskopie dargestellt werden konnten. Die Analyse der Infiltration wurde auf zwei Weisen durchgeführt. Die Berechnung der Zirkularität ist eine etablierte Methode um die Infiltration des umliegenden Gewebes aus einer runden Struktur zu bestimmen [316]. Je runder die Tumorsphäre ist, desto näher ist der Wert für die Zirkularität an 1, sodass ein höherer Wert für eine geringere Abwanderung der Zellen steht [314]. Der Vergleich der Kontrollzellen zu PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigte in den drei PRDX1 exprimierenden Zelllinien (Hs683, Ln229 und NCH612), dass die Reduktion von PRDX1 zu einer runderen Tumorsphäre führt (Abb. 12A, B und C). Dies legt die Annahme nahe, dass PRDX1 auch auf der natürlichen extrazellulären Matrix die Infiltration der Gliomzellen reguliert. Die Expression von PRDX1 in NCH1681 Zellen bestätigte dessen Einfluss auf die Bewegung der Zellen. Die Wiederherstellung der PRDX1 Expression erhöht die Zirkularität im Vergleich zu den Kontrollzellen (Abb. 12D). Die Hs683 Zellen wurden zusätzlich mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 behandelt. Dies erhöhte den Wert der Zirkularität auf das Niveau der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen, während die Behandlung auf die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen keinen weiteren Einfluss hatte. Demzufolge scheint PRDX1 die Infiltration des Gehirngewebes über die Aktivierung von p38 MAPK zu regulieren.

In dieser Arbeit wurde die Infiltration von Gliomzellen in das Gehirngewebe zusätzlich durch die Quantifizierung der abgewanderten Zellen bestimmt, um so die Unterschiede der Infiltration über einen längeren Zeitraum von fünf Tagen für Hs683 Zellen, NCH612 Zellen und NCH1681 Zellen zu beobachten. Die Ln229 Zellen zeigten bereits in dem Matrigel basierten Migrationsversuch eine erhöhte Migrationsfähigkeit, sodass diese nur für einen Tag auf den Schnitten inkubiert wurden. Die Untersuchung der Hs683 Zellen zeigte eine signifikante Reduktion der infiltrierten Zellen nach dem Verlust von PRDX1 in einer Entfernung zu der Tumorsphäre von 1-2 mm und 3-4 mm (Abb. 13A). Die Behandlung der Kontrollzellen mit SB203580 führte zu einer deutlichen Reduktion der infiltrierten Zellen im Abstand von 1-2 mm und 3-4 mm zu der Tumorsphäre, während die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen keinen weiteren Effekt auf die Anzahl der infiltrierten Zellen hat (Abb. 13A). Dies bestätigt ein weiteres Mal die Hypothese, dass PRDX1 über die Regulation der p38 MAPK

Aktivität die Migration der Gliomzellen beeinflusst. Die Ln229 Zellen zeigten im Vergleich von PRDX1<sup>KD</sup> und Kontrollzellen eine signifikante Reduktion der Infiltration von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen bei einer Distanz zu der Tumorsphäre von 2-3 mm. Der Unterschied in einer Entfernung von 3-4 mm ist mit einem Wert für die Ratio aus gezählten Zellen und der Fläche von 400 ebenfalls sehr groß, jedoch nicht signifikant da die Kontrollzellen eine hohe Standardabweichung aufwiesen. Möglicherweise würde sich die Standardabweichung der Kontrollzellen in einer Entfernung zur Tumorsphäre von 3-4 mm durch Auswertung von mehr Schnitten reduzieren und so zu einem signifikanten Unterschied führen. Bei den NCH612 Zellen und NCH1681 Zellen konnten keine Unterschiede zwischen PRDX1 exprimierend und nicht exprimierend verzeichnet werden. Diese niedergradigen Gliomzellen wachsen bereits als Sphären, die direkt auf die Hippocampuschnitte gesetzt werden konnten. Im Gegensatz zu den in *hanging drops* kultivierten Sphären der Ln229 Zellen und Hs683 Zellen bestanden die natürlich gewachsenen Tumorsphären aus einer variablen Anzahl von Tumorzellen. Dementsprechend ist die Ausgangszellzahl unterschiedlich, was einen Einfluss auf die Anzahl abgewanderter Zellen haben könnte, sodass im Vergleich zu der Zirkularität keine Unterschiede erkennbar waren. Die Zirkularität beruht im Gegensatz zu der Analyse der Zellanzahl auf der Form der Tumorsphäre und nicht auf der Anzahl der Zellen. Entsprechend wären eventuell signifikante Ergebnisse für die Anzahl infiltrierter Zellen erzielt worden, wären gleich große Sphären verwendet worden.

In den oberen Kapiteln wurde die Migration in einer drei dimensional Struktur untersucht, da sich alle durchgeführten Analysen auf den dynamischen Umbau des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen stützen. Invasion beruht auf dem Abbau bzw. Umbau der ECM durch Proteasen [18, 20]. Proteasen wie zum Beispiel MMPs und Seperasen binden an Integrine, die die Verbindung zwischen den Zellen und der Umgebung herstellen, um die ECM umzubauen [398-401]. Für die Bewegung von Gliomzellen wurde die mesenchymale Bewegung beschrieben [402]. Diese Form der Bewegung benötigt neben der Dynamik der Fokaladhäsionen [255, 403] und des Actin Zytoskeletts [404-406] den Abbau der ECM durch Proteasen, welche an den Fokaladhäsionen co-lokalisieren [14, 407, 408]. Die amöboide Bewegungsform wird ebenfalls von Krebszellen wie zum Beispiel den Zellen des kleinzelligen Lungenkrebs oder Prostatakrebszellen verwendet [409-411]. Befinden sich die Zellen in einer dreidimensionalen Matrix lokalisieren die Bestandteile der Fokaladhäsionen an den

Zellfortsätzen, bilden jedoch keine Komplexe aus [13, 412]. Essentiell für diese Bewegungsform ist der dynamische Umbau des Actin Zytoskeletts, sodass die Zellen durch die Änderung ihrer Form durch die Zwischenräume der ECM wandern können. In dieser Arbeit stand die Expression von Proteasen nicht im Vordergrund, sodass die analysierte Zellbewegung in der ECM als Infiltration bezeichnet wird. Die Zellbewegung in den zwei dimensional Versuchen unterliegt der Formation von Fokaladhäsionen und der Modulation von Actinfilamenten und weist eine mesenchymale Morphologie auf, jedoch werden keine Proteasen benötigt [15]. Die mesenchymale aber auch die amöboide Bewegung in einer drei dimensional ECM benötigt ebenfalls die dynamische Modulation der Actinfilamente, sodass die Ergebnisse der Actindynamik einen Hinweis auf die Motilität in zwei dimensionaler aber auch in drei dimensionaler Umgebung geben. Die erzielten Ergebnisse konnten dies bestätigen.

Zusammenfassend zeigten die Versuche der Migration im zwei bzw. drei dimensional Kontext sowie die Analyse der Actindynamik und des Umbaus der Fokaladhäsionen, dass der Verlust von PRDX1 die Migration reduziert. Die Tatsache dass die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 die Migration und die Dynamik des Actin Zytoskeletts sowie der Fokaladhäsionen nicht weiter reduziert gibt Anhalt, dass PRDX1 über den p38 MAPK Signalweg die Migration moduliert. Des Weiteren zeigte die Proteinanalyse, dass der Verlust von PRDX1 zu einer reduzierten Aktivierung von p38 MAPK führt. Dieser Effekt wurde zuvor für Bauchspeicheldrüsenkrebs durch die direkte Interaktion von PRDX1 und p38 MAPK beobachtet [370]. Weitere Studien konnten die Regulation von p38 MAPK durch PRDX1 über Zwischenschritte zeigen [165-167], sodass für Gliomzellen weitere Untersuchungen nötig sind um die Interaktionsqualität zwischen p38 MAPK und PRDX1 genauer zu beschreiben.

### **6.6 Implantation von PRDX1 modulierten Zellen in NOD/SCID/γ Mäuse**

In dieser Arbeit wurden wie schon in einer früheren Studie Hs683 Gliomzellen intrazerebral in NOD/SCID/γ Mäuse implantiert. In der Studie von D. Lamoral-Theys und Kollegen entwickelten sich je nach Behandlung Tumore innerhalb von 5 und 10 Monaten [307]. Da nach 10 Monaten keine der Mäuse Anzeichen einer Gliomerkrankung zeigten, wurden die Gehirne extrahiert. Die GFP Expression war nach dieser Zeit nicht mehr zu detektieren, sodass sich die Frage ergibt, ob die Reduktion von PRDX1 noch vorliegt. Dementsprechend wurde auf den Gehirnschnitte PRDX1 und der MHC1 angefärbt. Die Färbung von PRDX1 erscheint minimal reduziert in der PRDX1<sup>KD</sup> Kondition, während MHC1 in der Kontroll- und in der PRDX1<sup>KD</sup> Kondition die gleiche Färbung aufwies (Abb. 14). MHC1 ist spezifisch für

humane Zellen und zeigt eine Gliomatose ähnliche Infiltration der Zellen in das Gewebe mit fehlender Bildung einer Tumormasse. Dies entspricht jedoch nicht dem erwarteten Ergebnis der Hs683 Implantation, sodass wahrscheinlich die Färbung von MHC1 nicht spezifisch war. Normalerweise ist eine deutliche Färbung des Zellrandes *in vivo* zu sehen [413]. Die Färbung die in dieser Arbeit erzielt werden konnte, zeigte jedoch eine punktuelle Färbung von MHC1. Dies legt den Verdacht nahe, dass die implantierten Gliomzellen nicht tumorigen sind und im Gehirngewebe abgestorben sind. Die ATCC® gibt ebenfalls für diese Zelllinie an, dass sie nicht tumorigen ist, also nicht in der Lage ist Tumore auszubilden. Dem zu Folge wird in weiteren Studien der Effekt von PRDX1 auf Gliomzellen *in vivo* durch eine andere Zelllinie untersucht, dabei handelt es sich um die ebenfalls in dieser Arbeit verwendeten Ln229 Zellen. Diese zeigten in früheren Studien bereits, dass sie Tumore bilden können [414] und sind auch laut ATCC® tumorigen. Möglich wären aber auch alternative Mausmodelle für die Untersuchung von Gliomen, welche im Folgenden genauer beschrieben werden. Die generellen Ansprüche an Tiermodelle sind:

1. Die Histologie der humanen Tumore muss widerspiegelt werden
2. Die modifizierten Signalkaskaden sollten im Tiermodell ebenfalls auftreten
3. Die Umgebung der Tumore sollte die gleiche wie im Menschen sein
4. Die ursprünglichen Zellen müssen identifizierbar sein
5. Die Entstehung des Tumors muss zeitlich kontrollierbar sein
6. Das Tumorwachstum muss schnell und zuverlässig sein
7. Möglichst viele Gliomarten sollten abdeckbar sein

Die oben beschriebene Implantation von Tumorzellen in das Gehirn von Mäusen wird als entweder Xenotransplantation für humane Zellen oder allogene Transplantation für Zellen, die aus der gleichen Spezies wie der Empfänger sind, bezeichnet. Für die Xenotransplantation müssen die Mäuse immundefizient sein, sodass die fremden Zellen nicht durch das Immunsystem erkannt und abgebaut werden. Dementsprechend fehlt diesem Modell jedoch ein wichtiger Bestandteil der ECM. Bei dem allogenen Modell ist das Immunsystem weiterhin intakt, da es sich bei Mäusen um Mauszellen handelt und so keine Abstoßreaktion zu erwarten ist. Beide Formen haben die Vorteile, dass sie sehr reproduzierbar sind was die Tumorformation, -lokalisation und den Tod der Tiere angeht [415]. Jedoch werden die Zellen, die implantiert werden, zuvor in Kultur gehalten, dies verändert den Selektionsdruck, den die Zellen durch ihre Umgebung erhalten und stellt ein Nachteil dieser Methode dar. Die Tumorformation kann alternativ auch chemisch über DNA methylierende Substanzen induziert werden, da diese DNA Schäden hervorrufen und so die Krebsentstehung fördern [416]. Ein Beispiel für diese Methode war die Gewinnung der C6 Gliomzellen aus Ratten, die durch die Induktion mit Nitrosourea entstanden sind [417, 418]. Mit dieser Methode bleibt zwar die ECM der Zellen intakt, jedoch gibt es keinen Weg Einfluss

auf die entstehende Tumorart zu nehmen. Dies kann ein weiteres Tiermodell in dem auf genetischer Grundlage ein Tumor gebildet wird bieten. Unter diese Gruppe fällt das RCAS/tv-a Mausmodell für Gliome, dessen Grundlage die zellspezifische Expression eines aviären Rezeptors (tv-a Rezeptor) und die dazugehörige Infektion mit entsprechenden Viren ist. Für die Induktion von Gliomen gibt es drei Modellsysteme: 1. Ctv-a – der t-v-a Rezeptor wird unter dem Promotor der zyklischen Nukleotidphosphodiesterase exprimiert und ist spezifisch für die Bildung von Oligodendrogliomen [419]; 2. Ntv-a – der t-v-a Rezeptor wird unter der Kontrolle von dem Nestin Promotor exprimiert und ist spezifisch für neuronale und gliäre Stammzellen [420]; 3. Gtv-a – der tv-a Rezeptor wird in Saures Gliafaserprotein (GFAP) exprimierenden Zellen gebildet und führt nach entsprechender Infektion zu Astrozytomen [419]. Über die Infektion mit dem aviären Virus (RCAS) können Onkogene wie PDGF $\beta$  überexprimiert werden, um so die Tumorbildung zu fördern [421]. In die tv-a tragenden Tiere können weitere genetische Modulationen durch zum Beispiel Einkreuzung eingebracht werden. Das Einbringen des Ink4/Arf<sup>-/-</sup> Locus in Ntv-a Tiere (XFM) verbessert das Tumorwachstum im Vergleich zu Ntv-a Tieren alleine [422, 423]. Der Vergleich von Ntv-a und XFM Tieren zeigte deutliche Unterschiede, so bildeten in den XFM Tieren alle mit PDGF $\beta$  infizierten Tiere Tumore aus, die nach sieben Wochen zum Tod führten, während es in den Ntv-a Tieren lediglich 16% waren, die bis zu 35 Wochen überlebten [420]. Jedoch bildeten die zwei verschiedenen Modelle unterschiedliche Tumore aus, die XFM Tiere bildeten hochgradige Glioblastome aus, während die Ntv-a Tiere niedergradige Gliome ausbildeten. Analog dazu konnten die gleichen Beobachtungen für das Gtv-a Model gemacht werden. Die Ctv-a Tiere bildeten ebenfalls nur in 33% der infizierten Tiere Tumore aus. Dieses Tiermodell bieten viele Vorteile wie ein intaktes Immunsystem und eine gute Reproduzierbarkeit, hat jedoch für die einfachen Modelle ohne zusätzlichen genetischen Hintergrund eine schlechte Tumorbildungsrate und braucht lange um den Endpunkt zu erreichen. Dies könnte zu Problemen in der Versuchsdurchführung und –dauer führen. Zusammengefasst betrachtet bieten alle Mausmodelle gewisse Vorzüge aber auch Nachteile, sodass entsprechend des Versuchsziel das Modell gewählt werden sollte.

### **6.7 PRDX1 aktiviert p38 MAPK unabhängig von seiner Peroxidaseaktivität**

PRDX1 hat zwei verschiedene Funktionen – die Peroxidaseaktivität und die Chaperonfunktion. Die Cysteine an Position 52 und 173 (Cys52 und Cys173) sind die essentiellen Faktoren für die Peroxidasefunktion, während das Cystein an Position 83 (Cys83) für die Chaperonfunktion essentiell ist [153]. Für die Peroxidaseaktivität reicht die Bildung von Dimeren aus, während für die Chaperonfunktion ein Decamer zwingend erforderlich ist [154-157]. Die Hyperoxidation von PRDX1 Proteinen, die in einem Decamer gebunden sind, erhöht die Stabilität des Decamers, ist jedoch nicht essentiell für die

Chaperonfunktion [116, 126, 158]. p38 MAPK wurde als Ziel der durch PRDX1 induzierten Regulation identifiziert, wobei die Modulation der Phosphorylierung von p38 MAPK durch PRDX1 auf unterschiedliche zum Teil kontroverse Weisen beschrieben wurde. Drei Studien untersuchten die Regulation von p38 MAPK durch PRDX1 unter oxidativem Stress induziert durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Dabei konnte zum einen die Inhibition der p38 MAPK Phosphorylierung in Brustkrebszellen und MEFs durch MKP-5, dessen Inaktivierung bei oxidativem Stress durch PRDX1 verhindert wird [167]. Der Verlust von Cys52 und Cys173 hatte jedoch keinen Einfluss auf diese Signalkaskade. Des Weiteren wurde die Komplexbildung von ASK1 und PRDX1 über das Cys52 in HEK293T Zellen als H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unabhängiger Prozess beschrieben. Jedoch tritt ein Effekt der Inhibition von ASK1 erst nach der Behandlung mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf und führt zu einer reduzierten Phosphorylierung von p38 MAPK [166]. Im Gegensatz dazu wurde in der Arbeit von R.M. Jarvis und Kollegen gezeigt, dass PRDX1 ASK1 unter oxidativem Stress aktiviert und so die Phosphorylierung von p38 MAPK erhöht [165]. Der Verlust von PRDX1 reduziert jedoch die Phosphorylierung von p38 MAPK. K. Taniuchi und Kollegen untersuchten die Interaktion von PRDX1 und p38 MAPK unabhängig von oxidativem Stress. Diese Studie zeigte, dass PRDX1 eine direkte Interaktion mit p38 MAPK in Bauspeicheldrüsenkrebszellen eingeht [370]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Interaktion unabhängig von Cys52 und Cys173 ist, da der Austausch dieser Cysteine die Phosphorylierung von p38 MAPK nicht beeinflusste. Ähnliche Ergebnisse konnten auch in dieser Arbeit erzielt werden. Die Expression von PRDX1<sup>WT</sup> und PRDX1<sup>C52S</sup> erhöhten die Migration im *Boyden Chamber* Versuch während die PRDX1<sup>C83S</sup> Variante die Migration nicht steigern konnte (Abb. 18A). Die Proteinmengen der PRDX1 Expression wurde zusätzlich im *Western Blot* untersucht sodass ausgeschlossen werden konnte, dass die beobachteten Effekt auf Grund unterschiedlicher Proteinmengen entstanden sind (Abb. 18B). In den adhären wachsenden Gliomzellen Hs683 Zellen und Ln229 Zellen wurde das endogen exprimierte PRDX1 mittels einer shRNA gegen den 5' UTR der *PRDX1* mRNA reduziert und die Expression der *PRDX1* Varianten (*PRDX1*<sup>WT</sup>, *PRDX1*<sup>C52S</sup>, *PRDX1*<sup>C83S</sup> und *PRDX1*<sup>C173S</sup>) wurde eingeführt. In den Hs683 Zellen war eine Reduktion der mRNA Menge des endogenen *PRDX1* um 50% und eine ebenfalls gleichmäßige Expression der *PRDX1* Varianten auf mRNA Ebene zu beobachten (Abb. 19A). Auf Proteinebene konnten ebenfalls gleichmäßige Mengen beobachtet werden, lediglich die PRDX1<sup>C52S</sup> wies eine etwas stärkere Bande auf (Abb. 19B). In den Ln229 Zellen war ebenfalls eine Reduktion von etwa 50% der mRNA des endogenen PRDX1 zu beobachten, jedoch zeigten das Konstrukt für PRDX1<sup>C52S</sup> eine höhere Reduktion und das Konstrukt für PRDX1<sup>C83S</sup> eine geringere Reduktion. Die Expression der PRDX1 Varianten war ebenfalls unterschiedlich. Die höchste Expression wiesen *PRDX1*<sup>WT</sup> und *PRDX1*<sup>C173S</sup> auf, während *PRDX1*<sup>C52S</sup> und *PRDX1*<sup>C83S</sup> nur halb so stark auf mRNA Ebene exprimiert wurden (Abb. 19C). Die Analyse der Proteinmenge zeigte

jedoch eine gleichmäßige Bandenstärke für die verschiedenen PRDX1 Konstrukte (Abb. 19D). Das Epitop der verwendete Antikörper gegen PRDX1 ist jedoch nicht von dem Aminosäureaustausch betroffen, sodass der Antikörper alle PRDX1 Varianten binden kann. Dementsprechend ist es durchaus möglich, dass zum Beispiel in den PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen eine Mischung von endogenem und mutiertem PRDX1 vorliegt, sodass eventuell die beobachteten Effekte durch eine bessere Reduktion von endogenem PRDX1 und der gleichmäßigeren Expression der PRDX1 Varianten noch verstärkt werden würden. Die Ergebnisse der Migrationsversuche zeigten für die Ln229 Zellen und die Hs683 Zellen, dass alle PRDX1 Varianten außer PRDX1<sup>C83S</sup> die Migration steigern konnten (Abb. 18C-F). Dies spiegelt die bereits in NCH1681 Zellen erzielten Ergebnisse wieder und geht mit der Studie in Bauchspeicheldrüsenkrebszellen einher [370]. Dem zu Folge war für die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen zu erwarten, dass sich die PRDX1 Varianten PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> wie die PRDX1<sup>WT</sup> Variante verhalten und die PRDX1<sup>C83S</sup> Variante ähnlich wie der PRDX1<sup>KD</sup> Variante eine Reduktion der Dynamik aufweist. Die Änderung der Actinfilamentlänge über die Zeit zeigte erwartungsgemäß sowohl in den Ln229 Zellen als auch in den Hs683 Zellen eine signifikante Reduktion in den PRDX1<sup>C83S</sup> Variante während die anderen Varianten auf gleichem Niveau mit PRDX1<sup>WT</sup> Zellen sind (Abb. 20A und E). Das gleiche Muster zeigte sich in der Längenänderung der Fokaladhäsionen für beide Zelllinien (Abb. 20B und F). Zusätzlich wurde die Zu- und Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen quantifiziert. Dabei zeigte sich in den PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen ein verzögerter Aufbau von Vinculin an den Fokaladhäsionen, wobei die Abnahme von Vinculin ebenfalls verzögert ist (Abb. 20C-D und G-H). Dies entspricht dem Muster, das für die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen beobachtet werden konnte (Abb. 17C-D und G-H blaue Balken). Die anderen PRDX1 Varianten (PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup>) verhielten sich wie die PRDX1<sup>WT</sup> Variante und spiegelten die Dynamik der Kontrollzellen wieder. Der Mechanismus dem die Regulation der p38 MAPK Phosphorylierung durch PRDX1 in Gliomzellen unterliegt, bedarf noch weiterer ausführlicheren Untersuchungen wie zum Beispiel angelehnt an die Studie von K. Taniuchi und Kollegen [370] die kombinierte Immunpräzipitation von p38 MAPK und PRDX1 und der Bestimmung der Phosphorylierungsleveln von p38 MAPK. Diese Studie untersuchte als einzige die Modulation von p38 MAPK über PRDX1 ohne den Einfluss von oxidativem Stress und konnte ebenfalls Cys83 bzw. die Chaperonfunktion von PRDX1 als essentiellen Regulator identifizieren, dementsprechend erscheint der darin beschriebene Mechanismus am wahrscheinlichsten für die Regulation von p38 MAPK durch PRDX1 in Gliomzellen. Anderen Studien, die sich mit der Regulation von p38 MAPK durch PRDX1 beschäftigt haben, untersuchten die Regulation unter oxidativem Stress und zeigten zum Teil einen gegenteiligen Effekt zu den Beobachtungen dieser Arbeit [166, 167]. Zusätzlich unterlag die



Regulation über ASK1 dem Cystein an Position 52. Dementsprechend scheinen die darin beschriebenen Mechanismen über entweder MKP-5 oder ASK1 nicht der Situation in Gliomzellen zu entsprechen. Ein weitere Studie konnte unter oxidativem Stress den gleichen Effekt von PRDX1 auf p38 MAPK nachweisen wie diese Arbeit. Dabei wurde die Aktivierung von ASK1 durch PRDX1 und dadurch die höhere Phosphorylierung von p38 MAPK unter oxidativem Stress gezeigt [165]. Der genaue Mechanismus, der in Gliomzellen zum Tragen kommt, muss jedoch in weiteren Studien genauer identifiziert werden.

### 6.8 Ist die Inhibition von PRDX1 ein möglicher Therapieansatz?

PRDX1 ist in vielen Krebsarten überexprimiert und korreliert mit einer schlechteren Prognose für die betroffenen Patienten, wie zum Beispiel in Lungenkrebs [324], Brustkrebs [424, 425] oder Leberkrebs [426]. Der Verlust von PRDX1 hingegen führt neben der erhöhten Sensitivität auf Chemotherapeutika zu einer positiven Prognose für die Patienten, die zum Beispiel an Gliomen [9, 92], Prostatakrebs [323] oder Leukämie [311] erkrankt sind. In Leukämie erzielte die Inhibition von PRDX1 durch ein pflanzliches Diterpen Ade erste Erfolge [311]. Ade ist ein Diterpen aus der Pflanze *Rabdosia adenantha* [427] und wurde zunächst als spezifischer Inhibitor von PRDX1 und PRDX2 beschrieben, wobei die Bindungsaffinität zu PRDX2 deutlich niedriger als zu PRDX1 ist [311]. Die Studie von C.X. Liu und Kollegen konnte das Cys173 des PRDX1 Monomers als Bindungspartner von Ade identifizieren [311], jedoch zeigten spätere Studien dass Ade an den drei funktionellen Cysteinen von PRDX1 binden kann, sodass pro PRDX1 Monomer drei Ade Moleküle detektiert werden können [428]. Präzipitationsversuche zeigten, dass Ade neben PRDX1 auch Trx [429], die *Nuclear Factor ,kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells* (NFκB) Untereinheit p65 und *IkappaB Kinase β* (IKKβ) [430] bindet.

#### 6.8.1 Die Inhibition von PRDX1 erhöht die Sensitivität von Gliomzellen auf die Behandlung mit TMZ

Die Inhibition von PRDX1 erhöht die Sensitivität gegen über ROS induzierenden Therapien und führt zu einer besseren Prognose. Die Behandlung mit Ade konnte die Apoptose von Leberkrebszellen in einem Mausmodel erhöhen und verlängerte deren durchschnittliches Überleben [431]. Wie bereits beschrieben erhöht die Reduktion von PRDX1 die Sensitivität auf TMZ (Abb. 5A und [101]), die Inhibition von PRDX1 durch Ade führte erwartungsgemäß ebenfalls zu der Erhöhung der Sensitivität gegenüber TMZ (Abb. 5A blau gestreifte Balken).

6.8.2 Durch die Inhibition von PRDX1 wird die Migrationsfähigkeit der Gliomzellen reduziert

Die Inhibition von PRDX1 führte wie schon die Reduktion von PRDX1 zu einer verminderten Migration auf zwei und drei dimensionaler Matrix. Der Spaltschluss in den Hs683 Zellen, die mit Ade behandelt wurden war deutlich geringer als der von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen im Vergleich (Abb. 7A und B), während bei den Ln229 Zellen kein Unterschied zwischen PRDX1<sup>KD</sup> und Ade Behandlung zu erkennen war (Abb. 7C und D). Der geringere Spaltschluss in den Hs683 Zellen, die mit Ade behandelt wurden im Vergleich zu Hs683 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen könnte auf Grund eines inkompletten Verlust von PRDX1 entstehen. Die Behandlung von Hs683 mit Ade könnte so einen größeren Verlust der PRDX1 Funktion herbeiführen als der PRDX1<sup>KD</sup>. Im *Boyden Chamber* Versuch ohne ECM konnte die Reduktion der Migration durch Ade bestätigt werden. Die Behandlung von Hs683 Zellen, Ln229 Zellen und NCH612 Zellen mit Ade führte zu einer vergleichbaren Reduktion der Migration wie der Verlust von PRDX1 (Abb. 8A-C und E-G). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade konnte die Migration von Hs683 und NCH612 Zellen nicht weiter reduzieren, sodass von einem PRDX1 spezifischen Effekt auf die Migration ausgegangen werden kann (Abb. 8I und K). Ln229 PRDX1<sup>KD</sup> Zellen zeigten jedoch eine weitere Reduktion der Migration nach der Behandlung mit Ade (Abb. 8J), dies ist möglicherweise ein Effekt des inkompletten Verlustes von PRDX1 oder anderen Zielproteinen von Ade. Die NCH1681 Zellen exprimieren kein endogenes PRDX1. Durch die Behandlung mit Ade konnte die gesteigerte Migration in NCH1681 PRDX1<sup>Res</sup> Zellen auf das NCH1681 GFP Kontrollzellenniveau reduziert werden (Abb. 8L). Die Behandlung von NCH1681 GFP Zellen mit Ade hatte keine Auswirkungen auf die Migration, sodass Kontrollzellen und Ade behandelte Zellen die gleiche Migration zeigten (Abb. 8H). Zusammengenommen, zeigen diese Ergebnisse, dass Ade die Migration über die Inhibition von PRDX1 hemmt. Die Migration in einer drei dimensional Matrix verhält sich ähnlich wie die Migration ohne ECM. Sowohl im *Boyden Chamber* Versuch als auch im impedanzbasierten Versuch mit dem RTCA DP System konnte eine fast vollständige Inhibition der Migration nach der Behandlung von Ln299 Zellen mit Ade beobachtet werden (Abb. 10B und D). Auch die Untersuchungen auf der natürlichen ECM von Gliomzellen, dem Gehirn, verdeutlichten die *in vitro* beobachteten Effekte der PRDX1 Inhibition durch Ade. Die Behandlung von Hs683 und NCH612 Zellen mit Ade auf den organotypischen Gehirnschnitten zeigte, dass die Tumorsphären der Kontrollzellen deutlich runder waren als die DMSO behandelten (Abb. 12A und C). Die Inhibition von PRDX1 durch Ade in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen veränderte die Zirkularität der Tumorsphären nicht weiter. Die NCH1681 Zellen konnten den Effekt von PRDX1

und dessen Inhibition auf Gliomzellen bestätigen (Abb. 12D). Die in dieser Arbeit etablierte Auswertung der über längere Zeit in Gehirngewebe infiltrierten Zellen konnte den Einfluss von Ade auf die Migration von Hs683 Zellen bestätigen. Die Behandlung mit Ade reduzierte die Anzahl infiltrierter Hs683 Kontrollzellen signifikant bei 3-4 mm Entfernung zu der Tumorsphäre, während Ade auf die PRDX1<sup>KD</sup> Zellen keinen weiteren Effekt hatte (Abb. 13A). Die niedergradigen Gliomzellen NCH1681 und NCH612 zeigen keinen Effekt der PRDX1 Inhibition. Dies ist wie oben bereits erwähnt möglicherweise auf die unterschiedlich großen Tumorsphären zurückzuführen, da diese Zelllinien als Sphären wachsen und direkt verwendet wurden, während die Hs683 und die Ln229 Zellen aus einer definierten Anzahl von Zellen hergestellt wurden.

### 6.8.3 Die Behandlung von Gliomzellen mit Ade spiegelt die Morphologie der PRDX1 Reduktion wieder

Die Reduktion von PRDX1 führte in Gliomzellen zu einer abgerundeten Morphologie und einer zirkulären Nukleus assoziierten Anordnung des Actin Zytoskeletts in Hs683 Zellen und Ln229 Zellen (Abb. 15A-B und E-F). Die Behandlung der Kontrollzellen dieser Zelllinien reduzierte die Anzahl gespreiteter Zellen auf das Niveau der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen (Abb. 15C und G). Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade hatte in den Ln229 Zellen keinen weiteren Effekt, während in den Hs683 Zellen eine zusätzliche Reduktion von gespreiteten Zellen erkennbar war. Dies kann zum einen an dem nicht vollständigen Verlust der PRDX1 Expression in den Hs683 Zellen liegen oder zum anderen an eventuell anderen Proteinen, die durch Ade beeinflusst werden. Jedoch weisen die bisher beschriebenen Kontrollen bei denen PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade behandelt wurden daraufhin, dass der Effekt von Ade auf die Gliomzellen PRDX1 abhängig ist. In PRDX1<sup>KD</sup> Zellen wurde in den seltensten Fällen ein zusätzlicher Einfluss von Ade beobachtet, sodass die Vermutung nahe liegt, dass die einzelnen zusätzlichen Effekte auf Grund eines weniger starken Verlustes von PRDX1 zurück zuführen sind. Die Veränderung der Zellmorphologie durch die Behandlung mit Ade konnte bereits für Leberkrebszellen und NB4 Leukämie Zellen beschrieben werden. Die adhärent wachsenden Leberkrebszellen zeigten wie die Gliomzellen eine abgerundete Morphologie [431], während die in Suspension wachsenden NB4 Leukämie Zellen kleiner wurden [311]. Diese Studien konnten demnach die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse bestätigen.

### 6.8.4 Ade reguliert die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen durch Inhibition der Chaperonfunktion von PRDX1

Die Migrationsuntersuchung der NCH1681 Zellen, die entweder PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> oder PRDX1<sup>C83S</sup> exprimieren, gab einen ersten Hinweis darauf, dass Ade die Migration der Gliomzellen über das funktionelle Cystein an Position 83 reduziert. Die Behandlung von PRDX1<sup>WT</sup> Zellen und PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen mit Ade reduzierte die Anzahl der migrierten Zellen in *Boyden Chamber* Versuch auf das Niveau der Kontrollzellen und der PRDX1<sup>C83S</sup> Zellen (Abb. 18A und Abb. 8D). Die Untersuchung der Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen von Ln229 Zellen, die verschiedene PRDX1 Varianten anstatt der endogenen Variante exprimieren, konnte die in NCH1681 Zellen erhaltene Hypothese verstärken. Die Behandlung mit Ade reduzierte die Längenänderung der Actinfilamente über die Zeit in Ln229 Kontrollzellen, PRDX1<sup>WT</sup> Zellen, PRDX1<sup>C52S</sup> Zellen und PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen auf das Niveau der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen. Ade hatte jedoch keinen weiteren Einfluss auf die Längenänderung von Actinfilamenten über die Zeit in PRDX1<sup>KD</sup> Zellen und PRDX1<sup>C83S</sup> Zellen (Abb. 21A und E). Dementsprechend bestätigte sich der Verdacht, dass Ade über die Chaperonfunktion von PRDX1 die Gliomzellen beeinflusst. Dies konnte durch die Analyse der Fokaladhäsionsdynamik verifiziert werden. Die Längenänderung der Fokaladhäsionen wurde in Ln229 Kontrollzellen durch Ade signifikant reduziert. Die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit Ade verhinderte die Anlagerung von Vinculin in den Fokaladhäsionen, sodass keine Auswertung möglich war. Der Verlust von Vinculin an Fokaladhäsionen konnte bisher durch Ethanol induzierte ROS in C6 Gliomzellen gezeigt werden [432]. Jedoch zeigte die Reduktion von PRDX1 in Ln229 Gliomzellen keinen Verlust von Vinculin an den Fokaladhäsionen, sodass der Mechanismus über den Ade die Einlagerung von Vinculin in die Fokaladhäsionen der PRDX1<sup>KD</sup> Zellen verhindert eine weiterhin offene Frage bleibt. Die weitere Analyse der Längenänderung der Fokaladhäsionen identifizierte ebenfalls den Einfluss von Ade auf das Cystein an Position 83 des PRDX1 Proteins. Ade konnte die Längenänderung über die Zeit in PRDX1<sup>WT</sup>, PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup> Zellen reduzieren, während wie schon für die Actindynamik die Längenänderung der Fokaladhäsionen in PRDX1<sup>C83S</sup> ohne und mit Ade Behandlung gleich war (Abb. 21F). Die Beobachtung der Zu- und Abnahme von Vinculin an den Fokaladhäsionen bestätigten die Ergebnisse abermals. In Ln229 Kontrollzellen und PRDX1<sup>WT</sup> Zellen konnte die Ade Behandlung die Ergebnisse der PRDX1 Reduktion widerspiegeln. Dementsprechend wurde Vinculin langsamer in die Fokaladhäsionen eingebaut und war dafür über längere Zeit beständig (Abb. 21B-C und Abb. 22A-B). Die Untersuchung der PRDX1 Varianten mit Ade zeigte

ebenfalls, dass PRDX1<sup>C52S</sup> und PRDX1<sup>C173S</sup>, die ohne Behandlung die gleiche Dynamik wie die PRDX1<sup>WT</sup> Zellen aufwiesen, Vinculin langsamer in die Fokaladhäsionen einbauten und dass die Fokaladhäsionen länger beständig waren (Abb. 22C-D und G-H). Im Vergleich dazu wiesen die PRDX1<sup>C83S</sup> exprimierenden Zellen generell eine reduzierte Dynamik der Fokaladhäsionen auf, die sich durch die Behandlung mit Ade nicht weiter änderte (Abb. 22E-F).

Die Betrachtung dieser Ergebnisse deutet darauf hin, dass Ade nicht wie von C.X. Liu und Kollegen beschrieben ausschließlich das Cystein an Position an 173 von PRDX1 bindet [311]. Eine weitere Studie zeigte ebenfalls, dass die Überexpression von PRDX1<sup>C173S</sup> im Vergleich zu PRDX1<sup>WT</sup> in Leberkrebszellen den Effekt von Ade nicht reversieren konnte und so Cys173 als Interaktionspartner zu Ade identifizierte [431]. Diese Studie untersuchte jedoch nicht den Verlust der anderen funktionellen Cysteine sodass kein Rückschluss auf den Einfluss von Ade auf die Gesamtheit der funktionellen Cysteine gezogen werden kann. Die Ade Behandlung von Gliomzellen, in denen das Cys173 gegen Serin ausgetauscht wurde, zeigte in dieser Arbeit einen Effekt von Ade trotz des fehlenden Cys173. Diese Beobachtung bestätigte die Ergebnisse die in Leukämiezellen erzielt werden konnten und zeigte, dass pro PRDX1 Monomer drei Ade Moleküle binden können [428]. Insgesamt konnten bereits durchgeführte Tierstudien an Leukämie [311, 428] und experimenteller Autoimmunencephalitis (EAE) [430], einem Modell für Multiplesklerose [433], einen positiven Effekt von Ade auf die Reduktion des Tumorwachstums sowie das durchschnittliche Überleben der Tiere zeigen. Zusammengekommen mit den in dieser Arbeit erzielten Ergebnissen der Ade Behandlung von Gliomzellen *in vitro* und *ex vivo* erscheint die Inhibition von PRDX1 ein vielversprechender Ansatzpunkt für die Behandlung von Gliompatienten bei denen die Expression von PRDX1 nicht beeinträchtigt ist. In dieser Arbeit wurden sowohl niedergradige Gliomzellen als auch hochgradige Glioblastomzellen verwendet, in denen der Verlust bzw. die Inhibition von PRDX1 den gleichen positiven Effekt hatte. In Patienten wurde der Verlust der PRDX1 Expression bisher für alle WHO Grade beschrieben. Bei den Oligodendrogliomen (WHO Grad II und III) wurde der LOH 1p/19q als prognostischer Marker beschrieben [64, 434, 435], bei dem die PRDX1 Expression verloren geht [97, 101]. Astrozytome (WHO Grad II und III) zeigten in selteneren Fällen den partiellen LOH des Chromosomenarm 1p [434, 436], auf dem PRDX1 codiert ist, während in sekundären Glioblastomen (WHO Grad IV) die Hypermethylierung der CpG Inseln in der PRDX1 Promotorregion beschrieben wurde [101]. Im Gegensatz zu den bereits durchgeführten Tierstudien sind Gliome durch die Blut-Hirn-Schranke weniger gut durch Medikamente erreichbar als Tumore in anderen Organensystemen wie zum Beispiel Leberkrebs. Die Blut-Hirn-Schranke stellt eine zelluläre Barriere zum Schutz des Gehirns vor schädlichen

Substanzen dar und dient der Versorgung des Gehirns mit Nährstoffen [437]. Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus mehreren Zelltypen (Abb. 24). Die Grundlage bilden die Endothelzellen der Gefäße, die über *Tight Junctions* eng verbunden sind, sodass keine Substanzen aus dem Blut in das Gehirngewebe diffundieren können [438]. Perizyten sind in die Basallamina der Endothelzellen eingebettet und dienen der Vasoregulation [438-440]. An die Basallamina binden die Zellfortsätze der Astrozyten, welche eine Verbindung zu Neuronen ausbilden, um diese zum Beispiel mit Nährstoffen zu versorgen [438, 441]. Der Transport von Nährstoffen und anderen wichtigen Substanzen über die Blut-Hirn-Schranke wird über Transporter wie Aminosäure- und Glukosetransporter und Vesikeltransport reguliert [437]. Schädliche Stoffe werden über Effluxtransportern daran gehindert in das Gehirngewebe einzudringen. Diese Transporter basieren auf einer ATP Bindungskassette (ABC) und transportieren schädliche Substanzen aus den Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke zurück in das Gefäßlumen. In dieser Arbeit wurde die Affinität von Ade zu den P-glycoprotein Transportern (ABCB1) [442, 443] untersucht. Der Verlust dieser Transporter im Mausmodell ermöglicht das Eindringen von Substanzen wie bestimmte Medikamente, die normalerweise die Blut-Hirn-Schranke nicht überqueren können [444, 445]. Es gibt einige Erkrankungsbilder bei denen die Blut-Hirn-Schranke gestört ist wie zum Beispiel Multiple Sklerose und Krebserkrankungen [438, 440, 446]. Die Blut-Hirn-Schranke an Tumoren ist häufig strukturell verändert und wird Blut-Tumor-Schranke genannt [447]. Tumorzellen verdrängen die Astrozyten von der Blut-Hirn-Schranke [448] und lösen die *Tight Junctions* zum Beispiel durch die Sekretion von Bradykinin auf [449]. Der Verlust der Blut-Hirn-Schranken Integrität ist möglicherweise abhängig von dem Schweregrad der Gliome. Niedriggradige Gliome zeigten einen geringen Einfluss auf die Integrität der Blut-Hirn-Schranke [450], während hochgradige Gliome zu einer höchst undichten Blut-Hirn-Schranke also zu einer Ausbildung einer Blut-Tumor-Schranke führen [451]. Eine weitere Studie konnte zeigen, dass auf Blutgefäßen wandernde Gliomzellen die Blut-Hirn-Schranke auflösen können [448]. Die Blut-Hirn-Schranke verhindert häufig, dass Medikamente an den Wirkungsort Gehirn gelangen [452, 453]. Die Ausbildung einer Blut-Tumor-Schranke bei der die *Tight Junctions* defekt sind, ermöglicht eventuell, dass Medikamente an den Stellen an denen Tumorzellen mit den Blutgefäßen assoziiert sind eindringen können. Jedoch erreichen die Medikamente wohl nicht die Tumorzellen, die im Subarachnoidraum oder auf Fasertrakten lokalisiert sind. Dementsprechend stellt die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke für die Applikation von Medikamenten einen wichtigen Aspekt dar. Ade ist ein pflanzliches Diterpen, welches wahrscheinlich als schädliche Substanz identifiziert wird und die Blut-Hirn-Schranke nicht überwinden kann. Der Calcein-AM Test [454] bestätigte diesen Verdacht. Dieser Test basiert auf der Zugabe des Acetoxymethylesters von Calcein, welcher von Zellen aufgenommen und zu fluoreszierendem Calcein abgebaut wird. Das Calcein wird

normalerweise über ABC Transportern aus den Zellen transportiert, sind diese jedoch durch eine Substanz mit höherer Affinität zu den ABC Transportern blockiert, sammelt sich das Calcein in den Zellen und die Fluoreszenz kann gemessen werden (P-gp Wert) [455, 456]. Es ergibt sich daraus, dass je kleiner der P-gp Wert ist, desto höher ist die Affinität der Substanz zu den ABC Transportern. Beispielsweise wird Cyclosporin A sehr schnell durch ABC Transporter aus den Zellen transportiert und weist durchschnittlich einen P-gp Wert von zwei auf, während Quinidine die Blut-Hirn-Schranke gut überwinden kann und einen P-gp Wert von 55.5 hat [455]. Für Ade konnte ein P-gp Wert von 5.452 ermittelt werden (Abb. 23C), sodass davon ausgegangen werden kann, dass Ade die Blut-Hirn-Schranke nicht suffizient überwinden kann. Des Weiteren wurde die Neurotoxizität und die Toxizität auf die Epithelzellen der Blut-Hirn-Schranke getestet. Wie schon für Gliomzellen (Abb. 5A) konnte auch für Neurone und Epithelzellen keine Zytotoxizität festgestellt werden (Abb. 23A-B). Ade zeigte auch im EAE Mausmodell keine Toxizität für die Tiere, sodass Ade als potenter Inhibitor für PRDX1 eingesetzt werden könnte. Jedoch muss für die Applikation im Gehirn ein Weg gefunden werden Ade durch die Blut-Hirn-Schranke zu schleusen. Mögliche bisher diskutierte Ansatzpunkte sind die kurzzeitige Auflösung der Integrität der Blut-Hirn-Schranke, die Inhibition der ABC Transporter oder der aktive Transport über die Blut-Hirn-Schranke. Diese bisher erzielten Ergebnisse zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke werden in den folgenden Abschnitten erläutert.

- Verlust der Integrität der Blut-Hirn-Schranke

Erste Versuche die Blut-Hirn-Schranke zu umgehen war die Auflösung der *Tight Junctions*, um es Substanzen zu ermöglichen zwischen den Endothelzellen in das Gehirn zu diffundieren. Zum einen können die *Tight Junctions* durch die Infusion von hyperosmotischen Lösungen wie Mannitol kurzfristig aufgebrochen werden. Die Endothelzellen versuchen das osmotische Ungleichgewicht auszugleichen und verringern dabei ihr Volumen, wodurch die Abstände zwischen den Zellen vergrößert und die Blut-Hirn-Schranke durchlässig wird [457]. Das Fenster in der durch den osmotischen Druck die Blut-Hirn-Schranke durchlässig ist, kann zur Medikamentengaben verwendet werden. Die *Tight Junctions* können auch durch die Bindung von Bradykinin an die entsprechenden Rezeptoren gelöst werden [449]. Ein Bradykinin-Derivat namens RMP-7 befindet sich bereits in der klinischen Anwendung [458, 459]. RMP-7 zeigte Erfolge in den präklinischen Versuchen, die erste klinische Anwendung bei der RMP-7 in Kombination mit Carboplatin schlug jedoch fehl [460], sodass hier weiterer Entwicklungsbedarf besteht. Jedoch geht die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke mit nicht zu unterschätzenden Nebenwirkungen einher. Die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke

führt dazu, dass auch andere Moleküle in das Gehirngewebe eindringen können und dass mehr Liquor gebildet wird. Dies hat neben der erhöhten Neurotoxizität auch die Zunahme von neurologischen Defiziten wie Aphasie und Hemiparesen zur Folge [457]. In Anbetracht, dass innerhalb der letzten 40 Jahre die Kombination von Therapien mit der Öffnung der Blut-Hirn-Schranke keine Verbesserung der Behandlung von Gliompatienten erzielte [461, 462], legt den Verdacht nahe, dass eventuell alternative Wege zur Überquerung der Blut-Hirn-Schranke etabliert werden sollten.

- Inhibition der Effluxtransporter

Die Substitution von Medikamenten in das Gehirn von Mäusen ist wesentlich erfolgreicher, wenn die Effluxtransporter deletiert sind [463]. Die Inhibition der Transporter hat den Vorteil, dass die *Tight Junctions* nicht beeinflusst werden und die Integrität der Blut-Hirn-Schranke nicht gestört wird [464]. Bisher konnte in präklinischen Tierstudien gezeigt werden, dass Verapamil wesentlich besser in das Gehirn gelangt sobald es mit Tariquidar kombiniert wird [465, 466]. Neben Tariquidar wurde Elacridar als potenter Inhibitor der ABC Transporter beschrieben [467, 468], der in Mäusen zu einer besseren intrakraniellen Anreicherung von zum Beispiel Sorafenib [469], Sunitinib [470] und TMZ [471] beiträgt. Jedoch sind die bisher beschriebenen Inhibitoren des Effluxtransporter nicht wasserlöslich und haben eine schlechte Membrangängigkeit, dementsprechend stellt die Verbesserung der Eigenschaften der Inhibitoren bezüglich ihrer Bereitstellung an der Blut-Hirn-Schranke ein zukünftiges Forschungsziel dar [472].

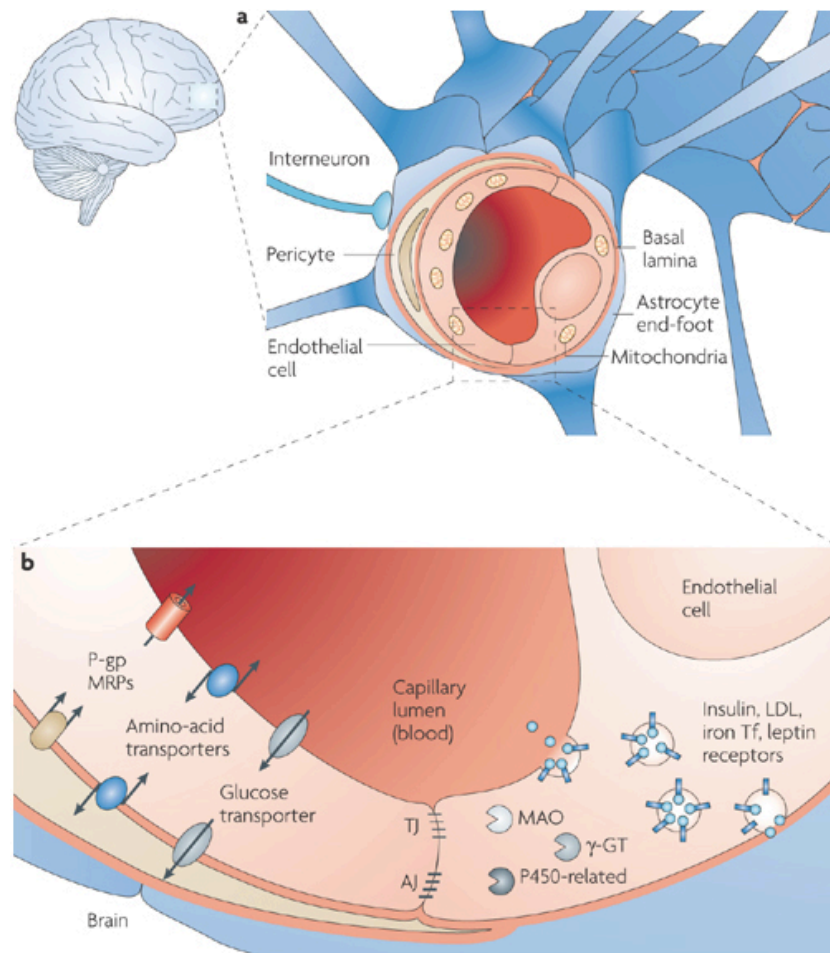
- Aktiver Transport über die Blut-Hirn-Schranke

Der aktive Transport über die Blut-Hirn-Schranke kann zum einen über Rezeptor gesteuerten oder über Vesikel gebundenen Transport ablaufen. Auch hierbei bleibt die Integrität der Blut-Hirn-Schranke intakt, sodass die *Tight Junctions* nicht aufgelöst werden. Um den aktiven Transport zu ermöglichen, müssen die Substanzen an bestimmte Transporter gebunden werden, wie zum Beispiel die Kopplung an Angiopep-2 Peptid [473] oder die Verpackung in Liposome [474]. Für Gliome und Brustkrebs befinden sich einige Angiopep-2 Peptid gekoppelte Medikamente in präklinischen Studien, darunter zum Beispiel der anti-Her2 monoklonale Antikörper [475, 476].

- Chirurgische Applikation von Medikamenten in das Gehirn



Ein anderer Weg ist die Medikamente direkt in das Gehirn zu applizieren. Hierbei gibt es bisher drei verschiedene Substitutionswege – das Ommaya Reservoir, die Gliadel Wafers und die *Convection enhanced delivery* (CED) Methode. Bei der Anwendung des Ommaya Reservoir wird ein intraventrikulärer Katheter implantiert an dem ein subkutanes Reservoir für die Medikamente angeschlossen ist. Die Medikamente gelangen durch den Katheter in das Liquor, dies wurde bereits für die Behandlung mit Methotrexat und Nitrosourea für Tumorpatienten etabliert [477, 478]. Jedoch bedarf diese Methode weiteren Optimierungen, da es häufig zu Infektionen, neurotoxischen Schäden und der Obstruktion des Katheters kommt, was die Substitution der Medikament beeinträchtigt [478, 479]. Die Gliadel Wafers werden für die lokale Applikation von Chemotherapeutika in Gliomen verwendet [480-483]. Hierfür wenden die Chemotherapeutika enthaltenden Membranen nach der Tumorresektion in die entstehende Höhle gegeben werden. Diese lokale Applikation des Chemotherapeutikums ist jedoch nicht ausreichend, um alle noch im Gehirngewebe enthaltenen Tumorzellen abzutöten, sodass ein rezidivierendes Gliom oftmals unvermeidbar ist [484, 485]. Zusätzlich zeigen die Gliadel Wafers häufig Nebenwirkungen wie neurotoxische Effekte und die Entstehung von Ödemen und Infektionen im Gehirn [453, 486]. Das letzte Applikationsverfahren, das CED System, befindet sich im experimentellen Status und bedarf noch einigen Verbesserungen in der Anwendung [478, 487, 488], an welchen zur Zeit gearbeitet wird [489, 490]. Das CED System basiert auf intrazerebral implantierten Mikrokathetern über welche mittels Überdruck die Medikamente in das Gehirngewebe gepumpt werden [488, 491, 492]. Jedoch stellt dieses Verfahren ebenfalls eine lokal begrenzte Substitution der Medikamente dar, sodass die Anwendung eher für inoperable Tumoren des Gehirns als Option dient.

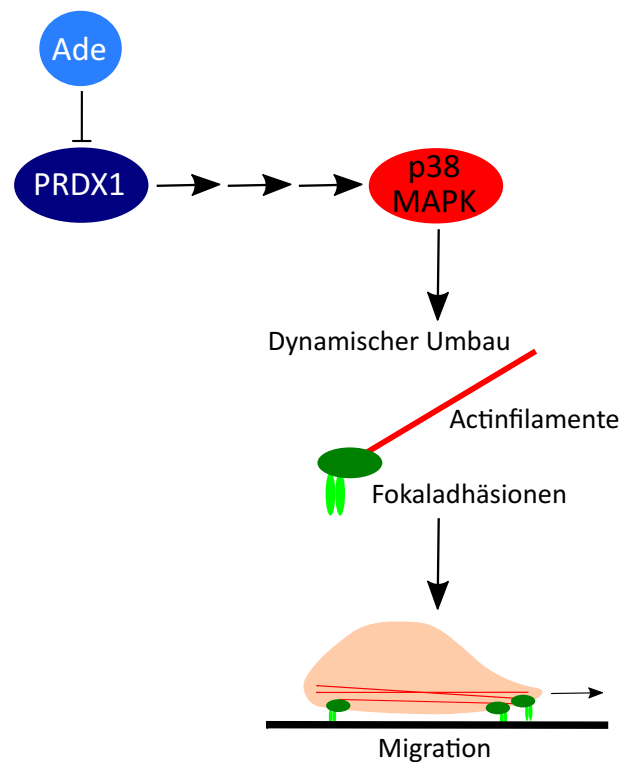


**Abb. 24 Struktur der Blut-Hirn-Schranke [437].** (A) Die Blut-Hirn-Schranke besteht aus den Endothelzellen der Kapillare, die von Perizyten und der Basallamina umschlossen sind. Die Zellfortsätze der Astrozyten binden an der Basallamina und bilden die abschließende Schicht der Blut-Hirn-Schranke. (B) Die Endothelzellen sind über „Tight Junctions“ eng verbunden, sodass keine Stoffe in das Gehirngewebe eindringen können. Der Transport in das Gehirn wird über Aminosäuretransporter und Glukosetransporter reguliert, zu dem können Stoffe die Blut-Hirn-Schranke über Vesikel überwinden. Die P-gp oder auch ABC Transporter verhindern, dass zum Beispiel schädliche Substanzen in das Gehirn eindringen.

Die Blut-Hirn-Schranke stellt demnach ein durchaus ernst zu nehmendes Problem für die Therapie von Gliomen dar und deren Überwindung steht neben der Erforschung neuer Ansatzpunkte für die Behandlung von Gliomen ebenfalls im Vordergrund.

Abschließend zeigten die Ergebnisse, dass PRDX1, das auf dem Chromosomenarm 1p lokalisiert ist, nicht nur ein prognostischer sondern auch ein funktioneller Marker für die Migration und Viabilität von Gliomzellen ist. PRDX1 scheint eine Hauptrolle für den prognostisch besseren Phänotyp der Gliome mit einem Verlust des chromosomalen Arms 1p zu spielen. Patienten denen der Chromosomenarm 1p fehlt überleben deutlich länger als Patienten bei denen dieser Arm intakt ist [92, 493]. Der Verlust bzw. die Inhibition von PRDX1 in Gliomzellen reduzierte die Migrationsfähigkeit und erhöhte die Sensitivität gegenüber TMZ deutlich. Der Effekt von PRDX1 auf die Migration wird wahrscheinlich über

die durch die Chaperonfunktion regulierte Aktivität von p38 MAPK gesteuert. Diese Hypothese konnte durch die Behandlung von PRDX1<sup>KD</sup> Zellen mit dem p38 MAPK Inhibitor SB203580 oder dem p38 MAPK Aktivator Anisomycin bestätigt werden. Jedoch muss der genauere Regulationsmechanismus von PRDX1 auf p38 MAPK noch weiter untersucht werden. Dennoch scheint der PRDX1 Inhibitor Ade geeignet für die Kombination mit den zur Zeit angewendeten Standardtherapien wie zum Beispiel TMZ. Jedoch müsste die Blut-Hirn-Schranken Gängigkeit von Ade für eine klinisch erfolgreiche Anwendung deutlich verbessert werden, wie zum Beispiel durch die Inhibition von ABC Transportern oder der Kombination mit Anhängen, die den aktiven Transport fördern. Dementsprechend ist die Inhibition von PRDX1 ein vielversprechender therapeutischer Ansatz, der jedoch vor der klinischen Anwendung noch einige Forschungsarbeit benötigt.



**Abb. 25 Zusammenfassung der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse.** Die Aktivität von p38 MAPK wird durch PRDX1 moduliert, dies beeinflusst die Dynamik des Actin Zytoskeletts und der Fokaladhäsionen und reguliert so die Migration der Gliomzellen. Ade ist ein Inhibitor von PRDX1 und führt zu dem gleichen Effekt wie der Verlust von PRDX1.

## Referenzen

1. Purves, D., *Neuroscience*. 4th ed. 2008, Sunderland, MA: Sinauer. 857 S.
2. Kleihues, P., et al., *The WHO classification of tumors of the nervous system*. J Neuropathol Exp Neurol, 2002. **61**(3): p. 215-25; discussion 226-9.
3. Larjavaara, S., et al., *Incidence of gliomas by anatomic location*. Neuro Oncol, 2007. **9**(3): p. 319-25.
4. Lim, D.A., et al., *Relationship of glioblastoma multiforme to neural stem cell regions predicts invasive and multifocal tumor phenotype*. Neuro Oncol, 2007. **9**(4): p. 424-9.
5. Stupp, R. and D.C. Weber, *The role of radio- and chemotherapy in glioblastoma*. Onkologie, 2005. **28**(6-7): p. 315-7.
6. Hadjipanayis, C.G. and E.G. Van Meir, *Tumor initiating cells in malignant gliomas: biology and implications for therapy*. J Mol Med (Berl), 2009. **87**(4): p. 363-74.
7. Burger, P.C., et al., *Glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. Pathologic criteria and prognostic implications*. Cancer, 1985. **56**(5): p. 1106-11.
8. Johnson, D.R. and B.P. O'Neill, *Glioblastoma survival in the United States before and during the temozolomide era*. J Neurooncol, 2012. **107**(2): p. 359-64.
9. Intergroup Radiation Therapy Oncology Group, T., et al., *Phase III trial of chemotherapy plus radiotherapy compared with radiotherapy alone for pure and mixed anaplastic oligodendroglioma: Intergroup Radiation Therapy Oncology Group Trial 9402*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2707-14.
10. Cavenee, W.K., *High-grade gliomas with chromosome 1p loss*. J Neurosurg, 2000. **92**(6): p. 1080-1.
11. Tonn, J.C. and R. Goldbrunner, *Mechanisms of glioma cell invasion*. Acta Neurochir Suppl, 2003. **88**: p. 163-7.
12. Friedl, P. and K. Wolf, *Tumour-cell invasion and migration: diversity and escape mechanisms*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(5): p. 362-74.
13. Friedl, P., S. Borgmann, and E.B. Bocker, *Amoeboid leukocyte crawling through extracellular matrix: lessons from the Dictyostelium paradigm of cell movement*. J Leukoc Biol, 2001. **70**(4): p. 491-509.
14. Wolf, K., et al., *Compensation mechanism in tumor cell migration: mesenchymal-amoeboid transition after blocking of pericellular proteolysis*. J Cell Biol, 2003. **160**(2): p. 267-77.
15. Lauffenburger, D.A. and A.F. Horwitz, *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell, 1996. **84**(3): p. 359-69.
16. Rutka, J.T., et al., *The extracellular matrix of the central and peripheral nervous systems: structure and function*. J Neurosurg, 1988. **69**(2): p. 155-70.
17. Giese, A., et al., *Determinants of human astrocytoma migration*. Cancer Res, 1994. **54**(14): p. 3897-904.
18. Friedl, P., et al., *Migration of coordinated cell clusters in mesenchymal and epithelial cancer explants in vitro*. Cancer Res, 1995. **55**(20): p. 4557-60.
19. Nabeshima, K., et al., *Ultrastructural study of TPA-induced cell motility: human well-differentiated rectal adenocarcinoma cells move as coherent sheets via localized modulation of cell-cell adhesion*. Clin Exp Metastasis, 1995. **13**(6): p. 499-508.
20. Hegerfeldt, Y., et al., *Collective cell movement in primary melanoma explants: plasticity of cell-cell interaction, beta1-integrin function, and migration strategies*. Cancer Res, 2002. **62**(7): p. 2125-30.
21. Brockmann, M.A., et al., *Glioblastoma and cerebral microvascular endothelial cell migration in response to tumor-associated growth factors*. Neurosurgery, 2003. **52**(6): p. 1391-9; discussion 1399.
22. Gonzalez-Perez, O. and A. Quinones-Hinojosa, *Dose-dependent effect of EGF on migration and differentiation of adult subventricular zone astrocytes*. Glia, 2010. **58**(8): p. 975-83.
23. Shih, A.H., et al., *Dose-dependent effects of platelet-derived growth factor-B on glial tumorigenesis*. Cancer Res, 2004. **64**(14): p. 4783-9.

24. Condeelis, J. and J.E. Segall, *Intravital imaging of cell movement in tumours*. Nat Rev Cancer, 2003. **3**(12): p. 921-30.
25. Sahai, E., *Mechanisms of cancer cell invasion*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 87-96.
26. Chicoine, M.R. and D.L. Silbergeld, *Mitogens as motogens*. J Neurooncol, 1997. **35**(3): p. 249-57.
27. Piperi, C., et al., *Evidence of improved serum fatty acid profile of postmenopausal women receiving atorvastatin and raloxifene*. J Obstet Gynaecol, 2005. **25**(5): p. 476-81.
28. Palecek, S.P., et al., *Integrin-ligand binding properties govern cell migration speed through cell-substratum adhesiveness*. Nature, 1997. **385**(6616): p. 537-40.
29. Hynes, R.O., *Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion*. Cell, 1992. **69**(1): p. 11-25.
30. Giese, A., et al., *Migration of human glioma cells in response to tumour cyst fluids*. Acta Neurochir (Wien), 1996. **138**(11): p. 1331-40.
31. Merzak, A., et al., *Control of human glioma cell growth, migration and invasion in vitro by transforming growth factor beta 1*. Br J Cancer, 1994. **70**(2): p. 199-203.
32. Abounader, R., *Interactions between PTEN and receptor tyrosine kinase pathways and their implications for glioma therapy*. Expert Rev Anticancer Ther, 2009. **9**(2): p. 235-45.
33. Arora, A. and E.M. Scholar, *Role of tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy*. J Pharmacol Exp Ther, 2005. **315**(3): p. 971-9.
34. Huang, T.T., et al., *Targeted therapy for malignant glioma patients: lessons learned and the road ahead*. Neurotherapeutics, 2009. **6**(3): p. 500-12.
35. Zwick, E., J. Bange, and A. Ullrich, *Receptor tyrosine kinase signalling as a target for cancer intervention strategies*. Endocr Relat Cancer, 2001. **8**(3): p. 161-73.
36. Giese, A. and M. Westphal, *Glioma invasion in the central nervous system*. Neurosurgery, 1996. **39**(2): p. 235-50; discussion 250-2.
37. Giese, A., et al., *Migration of human glioma cells on myelin*. Neurosurgery, 1996. **38**(4): p. 755-64.
38. Bernstein, J.J. and C.A. Woodard, *Glioblastoma cells do not intravasate into blood vessels*. Neurosurgery, 1995. **36**(1): p. 124-32; discussion 132.
39. Montana, V. and H. Sontheimer, *Bradykinin promotes the chemotactic invasion of primary brain tumors*. J Neurosci, 2011. **31**(13): p. 4858-67.
40. Venstrom, K.A. and L.F. Reichardt, *Extracellular matrix. 2: Role of extracellular matrix molecules and their receptors in the nervous system*. FASEB J, 1993. **7**(11): p. 996-1003.
41. Giese, A., et al., *Specific attachment and migration of human astrocytoma cells on human but not murine laminin*. Glia, 1995. **13**(1): p. 64-74.
42. Luna, E.J. and A.L. Hitt, *Cytoskeleton--plasma membrane interactions*. Science, 1992. **258**(5084): p. 955-64.
43. Guan, J.L. and D. Shalloway, *Regulation of focal adhesion-associated protein tyrosine kinase by both cellular adhesion and oncogenic transformation*. Nature, 1992. **358**(6388): p. 690-2.
44. Hanks, S.K., et al., *Focal adhesion protein-tyrosine kinase phosphorylated in response to cell attachment to fibronectin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(18): p. 8487-91.
45. Chen, Q., et al., *Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases*. J Biol Chem, 1994. **269**(43): p. 26602-5.
46. Arita, N., M. Taneda, and T. Hayakawa, *Leptomeningeal dissemination of malignant gliomas. Incidence, diagnosis and outcome*. Acta Neurochir (Wien), 1994. **126**(2-4): p. 84-92.
47. Erlich, S.S. and R.L. Davis, *Spinal subarachnoid metastasis from primary intracranial glioblastoma multiforme*. Cancer, 1978. **42**(6): p. 2854-64.

48. Oohira, A., F. Matsui, and R. Katoh-Semba, *Inhibitory effects of brain chondroitin sulfate proteoglycans on neurite outgrowth from PC12D cells*. J Neurosci, 1991. **11**(3): p. 822-7.
49. Perris, R. and S. Johansson, *Inhibition of neural crest cell migration by aggregating chondroitin sulfate proteoglycans is mediated by their hyaluronan-binding region*. Dev Biol, 1990. **137**(1): p. 1-12.
50. Schwab, M.E. and P. Caroni, *Oligodendrocytes and CNS myelin are nonpermissive substrates for neurite growth and fibroblast spreading in vitro*. J Neurosci, 1988. **8**(7): p. 2381-93.
51. Paganetti, P.A., P. Caroni, and M.E. Schwab, *Glioblastoma infiltration into central nervous system tissue in vitro: involvement of a metalloprotease*. J Cell Biol, 1988. **107**(6 Pt 1): p. 2281-91.
52. Burger, P.C., et al., *Topographic anatomy and CT correlations in the untreated glioblastoma multiforme*. J Neurosurg, 1988. **68**(5): p. 698-704.
53. Maxwell, H.P., *The incidence of interhemispheric extension of glioblastoma multiforme through the corpus callosum*. J Neurosurg, 1946. **3**: p. 54-7.
54. Malek-Hedayat, S. and L.H. Rome, *Expression of a beta 1-related integrin by oligodendroglia in primary culture: evidence for a functional role in myelination*. J Cell Biol, 1994. **124**(6): p. 1039-46.
55. Goldberg, W.J., E.R. Laws, Jr., and J.J. Bernstein, *Individual C6 glioma cells migrate in adult rat brain after neural homografting*. Int J Dev Neurosci, 1991. **9**(4): p. 427-37.
56. Louis, D.N., et al., *The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system*. Acta Neuropathol, 2007. **114**(2): p. 97-109.
57. Lassman, A.B., *Molecular biology of gliomas*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2004. **4**(3): p. 228-33.
58. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 98-110.
59. Phillips, H.S., et al., *Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis*. Cancer Cell, 2006. **9**(3): p. 157-73.
60. Hartmann, C., et al., *Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas*. Acta Neuropathol, 2010. **120**(6): p. 707-18.
61. Ducray, F., et al., *Anaplastic oligodendrogliomas with 1p19q codeletion have a proneural gene expression profile*. Mol Cancer, 2008. **7**: p. 41.
62. Turkalp, Z., J. Karamchandani, and S. Das, *IDH mutation in glioma: new insights and promises for the future*. JAMA Neurol, 2014. **71**(10): p. 1319-25.
63. Liu, X. and Z.Q. Ling, *Role of isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH 1/2) gene mutations in human tumors*. Histol Histopathol, 2015. **30**(10): p. 1155-60.
64. Cancer Genome Atlas Research, N., et al., *Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2481-98.
65. Reuss, D.E., et al., *Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities*. Acta Neuropathol, 2015. **130**(3): p. 407-17.
66. Eckel-Passow, J.E., et al., *Glioma Groups Based on 1p/19q, IDH, and TERT Promoter Mutations in Tumors*. N Engl J Med, 2015. **372**(26): p. 2499-508.
67. Sahm, F., et al., *Farewell to oligoastrocytoma: in situ molecular genetics favor classification as either oligodendroglioma or astrocytoma*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(4): p. 551-9.
68. Wiestler, B., et al., *Integrated DNA methylation and copy-number profiling identify three clinically and biologically relevant groups of anaplastic glioma*. Acta Neuropathol, 2014. **128**(4): p. 561-71.
69. Baylin, S.B., *DNA methylation and gene silencing in cancer*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2 Suppl 1**: p. S4-11.

70. Tano, K., et al., *Isolation and structural characterization of a cDNA clone encoding the human DNA repair protein for O6-alkylguanine*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(2): p. 686-90.
71. Shiraishi, A., K. Sakumi, and M. Sekiguchi, *Increased susceptibility to chemotherapeutic alkylating agents of mice deficient in DNA repair methyltransferase*. Carcinogenesis, 2000. **21**(10): p. 1879-83.
72. Morandi, L., et al., *Promoter methylation analysis of O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastoma: detection by locked nucleic acid based quantitative PCR using an imprinted gene (SNURF) as a reference*. BMC Cancer, 2010. **10**: p. 48.
73. Quillien, V., et al., *Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients*. Cancer, 2012. **118**(17): p. 4201-11.
74. Hegi, M.E., et al., *MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 997-1003.
75. Paz, M.F., et al., *CpG island hypermethylation of the DNA repair enzyme methyltransferase predicts response to temozolomide in primary gliomas*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 4933-8.
76. Molenaar, R.J., et al., *The combination of IDH1 mutations and MGMT methylation status predicts survival in glioblastoma better than either IDH1 or MGMT alone*. Neuro Oncol, 2014. **16**(9): p. 1263-73.
77. Wiestler, B., et al., *Assessing CpG island methylator phenotype, 1p/19q codeletion, and MGMT promoter methylation from epigenome-wide data in the biomarker cohort of the NOA-04 trial*. Neuro Oncol, 2014. **16**(12): p. 1630-8.
78. Sugawa, N., et al., *Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(21): p. 8602-6.
79. Wong, A.J., et al., *Structural alterations of the epidermal growth factor receptor gene in human gliomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(7): p. 2965-9.
80. Guillaudeau, A., et al., *Adult diffuse gliomas produce mRNA transcripts encoding EGFR isoforms lacking a tyrosine kinase domain*. Int J Oncol, 2012. **40**(4): p. 1142-52.
81. Pelloski, C.E., et al., *Epidermal growth factor receptor variant III status defines clinically distinct subtypes of glioblastoma*. J Clin Oncol, 2007. **25**(16): p. 2288-94.
82. Petitjean, A., et al., *TP53 mutations in human cancers: functional selection and impact on cancer prognosis and outcomes*. Oncogene, 2007. **26**(15): p. 2157-65.
83. Brennan, C.W., et al., *The somatic genomic landscape of glioblastoma*. Cell, 2013. **155**(2): p. 462-77.
84. Matoba, S., et al., *p53 regulates mitochondrial respiration*. Science, 2006. **312**(5780): p. 1650-3.
85. Sahm, F., et al., *Next-generation sequencing in routine brain tumor diagnostics enables an integrated diagnosis and identifies actionable targets*. Acta Neuropathol, 2015.
86. Peraud, A., et al., *Prognostic impact of TP53 mutations and P53 protein overexpression in supratentorial WHO grade II astrocytomas and oligoastrocytomas*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(5): p. 1117-24.
87. Ozawa, T., et al., *Most human non-GCIMP glioblastoma subtypes evolve from a common proneural-like precursor glioma*. Cancer Cell, 2014. **26**(2): p. 288-300.
88. Doucette, T., et al., *Immune heterogeneity of glioblastoma subtypes: extrapolation from the cancer genome atlas*. Cancer Immunol Res, 2013. **1**(2): p. 112-22.
89. Louis, D.N., et al., *International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading*. Brain Pathol, 2014. **24**(5): p. 429-35.
90. Louis, D.N., et al., *The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Acta Neuropathol, 2016. **131**(6): p. 803-20.

91. Cooper, L.A., et al., *The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas*. PLoS One, 2010. **5**(9): p. e12548.
92. Mariani, L., et al., *Loss of heterozygosity 1p36 and 19q13 is a prognostic factor for overall survival in patients with diffuse WHO grade 2 gliomas treated without chemotherapy*. J Clin Oncol, 2006. **24**(29): p. 4758-63.
93. Louis, D.N., E.C. Holland, and J.G. Cairncross, *Glioma classification: a molecular reappraisal*. Am J Pathol, 2001. **159**(3): p. 779-86.
94. Griffin, C.A., et al., *Identification of der(1;19)(q10;p10) in five oligodendrogliomas suggests mechanism of concurrent 1p and 19q loss*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(10): p. 988-94.
95. Jenkins, R.B., et al., *A t(1;19)(q10;p10) mediates the combined deletions of 1p and 19q and predicts a better prognosis of patients with oligodendroglioma*. Cancer Res, 2006. **66**(20): p. 9852-61.
96. Dong, S., et al., *Transcriptional inactivation of TP73 expression in oligodendroglial tumors*. Int J Cancer, 2002. **98**(3): p. 370-5.
97. Tews, B., et al., *Identification of novel oligodendroglioma-associated candidate tumor suppressor genes in 1p36 and 19q13 using microarray-based expression profiling*. Int J Cancer, 2006. **119**(4): p. 792-800.
98. Pohl, U., J.G. Cairncross, and D.N. Louis, *Homozygous deletions of the CDKN2C/p18INK4C gene on the short arm of chromosome 1 in anaplastic oligodendrogliomas*. Brain Pathol, 1999. **9**(4): p. 639-43.
99. Wolf, R.M., et al., *p190RhoGAP can act to inhibit PDGF-induced gliomas in mice: a putative tumor suppressor encoded on human chromosome 19q13.3*. Genes Dev, 2003. **17**(4): p. 476-87.
100. Kunitz, A., et al., *DNA hypermethylation and aberrant expression of the EMP3 gene at 19q13.3 in Human Gliomas*. Brain Pathol, 2007. **17**(4): p. 363-70.
101. Dittmann, L.M., et al., *Downregulation of PRDX1 by promoter hypermethylation is frequent in 1p/19q-deleted oligodendroglial tumours and increases radio- and chemosensitivity of Hs683 glioma cells in vitro*. Oncogene, 2012. **31**(29): p. 3409-18.
102. Boots-Sprenger, S.H., et al., *Significance of complete 1p/19q co-deletion, IDH1 mutation and MGMT promoter methylation in gliomas: use with caution*. Mod Pathol, 2013. **26**(7): p. 922-9.
103. Chae, H.Z., et al., *Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1994. **91**(15): p. 7017-21.
104. Chae, H.Z., S.J. Chung, and S.G. Rhee, *Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast*. J Biol Chem, 1994. **269**(44): p. 27670-8.
105. Seaver, L.C. and J.A. Imlay, *Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. **183**(24): p. 7173-81.
106. Hofmann, B., H.J. Hecht, and L. Flohe, *Peroxiredoxins*. Biol Chem, 2002. **383**(3-4): p. 347-64.
107. Jacobson, F.S., et al., *An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties*. J Biol Chem, 1989. **264**(3): p. 1488-96.
108. Poole, L.B. and H.R. Ellis, *Flavin-dependent alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium. 1. Purification and enzymatic activities of overexpressed AhpF and AhpC proteins*. Biochemistry, 1996. **35**(1): p. 56-64.
109. Bryk, R., P. Griffin, and C. Nathan, *Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins*. Nature, 2000. **407**(6801): p. 211-5.
110. Peshenko, I.V. and H. Shichi, *Oxidation of active center cysteine of bovine 1-Cys peroxiredoxin to the cysteine sulfenic acid form by peroxide and peroxynitrite*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(3): p. 292-303.



111. Fujii, J. and Y. Ikeda, *Advances in our understanding of peroxiredoxin, a multifunctional, mammalian redox protein*. Redox Rep, 2002. **7**(3): p. 123-30.
112. Ellis, H.R. and L.B. Poole, *Novel application of 7-chloro-4-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole to identify cysteine sulfenic acid in the AhpC component of alkyl hydroperoxide reductase*. Biochemistry, 1997. **36**(48): p. 15013-8.
113. Choi, H.J., et al., *Crystal structure of a novel human peroxidase enzyme at 2.0 Å resolution*. Nat Struct Biol, 1998. **5**(5): p. 400-6.
114. Ellis, H.R. and L.B. Poole, *Roles for the two cysteine residues of AhpC in catalysis of peroxide reduction by alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium*. Biochemistry, 1997. **36**(43): p. 13349-56.
115. Hirotsu, S., et al., *Crystal structure of a multifunctional 2-Cys peroxiredoxin heme-binding protein 23 kDa/proliferation-associated gene product*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(22): p. 12333-8.
116. Schroder, E., et al., *Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution*. Structure, 2000. **8**(6): p. 605-15.
117. Alpey, M.S., et al., *The structure of reduced trypanothione peroxidase reveals a decamer and insight into reactivity of 2Cys-peroxiredoxins*. J Mol Biol, 2000. **300**(4): p. 903-16.
118. Wood, Z.A., et al., *Dimers to doughnuts: redox-sensitive oligomerization of 2-cysteine peroxiredoxins*. Biochemistry, 2002. **41**(17): p. 5493-504.
119. Nogoceke, E., et al., *A unique cascade of oxidoreductases catalyses trypanothione-mediated peroxide metabolism in Crithidia fasciculata*. Biol Chem, 1997. **378**(8): p. 827-36.
120. Poole, L.B., et al., *AhpF and other NADH:peroxiredoxin oxidoreductases, homologues of low Mr thioredoxin reductase*. Eur J Biochem, 2000. **267**(20): p. 6126-33.
121. Bryk, R., et al., *Metabolic enzymes of mycobacteria linked to antioxidant defense by a thioredoxin-like protein*. Science, 2002. **295**(5557): p. 1073-7.
122. Seo, M.S., et al., *Identification of a new type of mammalian peroxiredoxin that forms an intramolecular disulfide as a reaction intermediate*. J Biol Chem, 2000. **275**(27): p. 20346-54.
123. Declercq, J.P., et al., *Crystal structure of human peroxiredoxin 5, a novel type of mammalian peroxiredoxin at 1.5 Å resolution*. J Mol Biol, 2001. **311**(4): p. 751-9.
124. Fisher, A.B., et al., *Phospholipid hydroperoxides are substrates for non-selenium glutathione peroxidase*. J Biol Chem, 1999. **274**(30): p. 21326-34.
125. Lee, S.P., et al., *Cyclophilin A binds to peroxiredoxins and activates its peroxidase activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(32): p. 29826-32.
126. Wood, Z.A., et al., *Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(1): p. 32-40.
127. Harris, J.R., et al., *Comparison of the decameric structure of peroxiredoxin-II by transmission electron microscopy and X-ray crystallography*. Biochim Biophys Acta, 2001. **1547**(2): p. 221-34.
128. Schroder, E., A.C. Willis, and C.P. Ponting, *Porcine natural-killer-enhancing factor-B: oligomerisation and identification as a calpain substrate in vitro*. Biochim Biophys Acta, 1998. **1383**(2): p. 279-91.
129. Reynolds, C.M., J. Meyer, and L.B. Poole, *An NADH-dependent bacterial thioredoxin reductase-like protein in conjunction with a glutaredoxin homologue form a unique peroxiredoxin (AhpC) reducing system in Clostridium pasteurianum*. Biochemistry, 2002. **41**(6): p. 1990-2001.
130. Kitano, K., et al., *Stimulation of peroxidase activity by decamerization related to ionic strength: AhpC protein from Amphibacillus xylanus*. J Biochem, 1999. **126**(2): p. 313-9.
131. Chauhan, R. and S.C. Mande, *Characterization of the Mycobacterium tuberculosis H37Rv alkyl hydroperoxidase AhpC points to the importance of ionic interactions in oligomerization and activity*. Biochem J, 2001. **354**(Pt 1): p. 209-15.

132. Claiborne, A., et al., *Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation*. Biochemistry, 1999. **38**(47): p. 15407-16.
133. Rabilloud, T., et al., *Proteomics analysis of cellular response to oxidative stress. Evidence for in vivo overoxidation of peroxiredoxins at their active site*. J Biol Chem, 2002. **277**(22): p. 19396-401.
134. van den Bent, M.J., et al., *Adjuvant procarbazine, lomustine, and vincristine improves progression-free survival but not overall survival in newly diagnosed anaplastic oligodendrogliomas and oligoastrocytomas: a randomized European Organisation for Research and Treatment of Cancer phase III trial*. J Clin Oncol, 2006. **24**(18): p. 2715-22.
135. Fang, Y.Z., S. Yang, and G. Wu, *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. Nutrition, 2002. **18**(10): p. 872-9.
136. Klaunig, J.E., et al., *The role of oxidative stress in chemical carcinogenesis*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 1**: p. 289-95.
137. Vafa, O., et al., *c-Myc can induce DNA damage, increase reactive oxygen species, and mitigate p53 function: a mechanism for oncogene-induced genetic instability*. Mol Cell, 2002. **9**(5): p. 1031-44.
138. Thorgeirsson, S.S., V.M. Factor, and E.G. Snyderwine, *Transgenic mouse models in carcinogenesis research and testing*. Toxicol Lett, 2000. **112-113**: p. 553-5.
139. Lee, A.C., et al., *Ras proteins induce senescence by altering the intracellular levels of reactive oxygen species*. J Biol Chem, 1999. **274**(12): p. 7936-40.
140. Egler, R.A., et al., *Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-Myc function by peroxiredoxin 1*. Oncogene, 2005. **24**(54): p. 8038-50.
141. de Souza-Pinto, N.C., et al., *Repair of 8-oxodeoxyguanosine lesions in mitochondrial dna depends on the oxoguanine dna glycosylase (OGG1) gene and 8-oxoguanine accumulates in the mitochondrial dna of OGG1-defective mice*. Cancer Res, 2001. **61**(14): p. 5378-81.
142. Karahalil, B., et al., *Compromised incision of oxidized pyrimidines in liver mitochondria of mice deficient in NTH1 and OGG1 glycosylases*. J Biol Chem, 2003. **278**(36): p. 33701-7.
143. Slupphaug, G., B. Kavli, and H.E. Krokan, *The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage*. Mutat Res, 2003. **531**(1-2): p. 231-51.
144. Rhee, S.G., *Cell signaling. H2O2, a necessary evil for cell signaling*. Science, 2006. **312**(5782): p. 1882-3.
145. Woo, H.A., et al., *Inactivation of peroxiredoxin I by phosphorylation allows localized H(2)O(2) accumulation for cell signaling*. Cell, 2010. **140**(4): p. 517-28.
146. Niethammer, P., et al., *A tissue-scale gradient of hydrogen peroxide mediates rapid wound detection in zebrafish*. Nature, 2009. **459**(7249): p. 996-9.
147. Nguyen, T., P.J. Sherratt, and C.B. Pickett, *Regulatory mechanisms controlling gene expression mediated by the antioxidant response element*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2003. **43**: p. 233-60.
148. Kim, Y.J., et al., *Human prx1 gene is a target of Nrf2 and is up-regulated by hypoxia/reoxygenation: implication to tumor biology*. Cancer Res, 2007. **67**(2): p. 546-54.
149. Ishii, T., et al., *Transcription factor Nrf2 coordinately regulates a group of oxidative stress-inducible genes in macrophages*. J Biol Chem, 2000. **275**(21): p. 16023-9.
150. Prosperi, M.T., et al., *A human cDNA corresponding to a gene overexpressed during cell proliferation encodes a product sharing homology with amoebic and bacterial proteins*. J Biol Chem, 1993. **268**(15): p. 11050-6.
151. Diet, A., et al., *Regulation of peroxiredoxins by nitric oxide in immunostimulated macrophages*. J Biol Chem, 2007. **282**(50): p. 36199-205.
152. Ishii, T., et al., *Cloning and characterization of a 23-kDa stress-induced mouse peritoneal macrophage protein*. J Biol Chem, 1993. **268**(25): p. 18633-6.
153. Lee, W., et al., *Human peroxiredoxin 1 and 2 are not duplicate proteins: the unique presence of CYS83 in Prx1 underscores the structural and functional differences between Prx1 and Prx2*. J Biol Chem, 2007. **282**(30): p. 22011-22.

154. Barranco-Medina, S., J.J. Lazaro, and K.J. Dietz, *The oligomeric conformation of peroxiredoxins links redox state to function*. FEBS Lett, 2009. **583**(12): p. 1809-16.
155. Jang, H.H., et al., *Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function*. Cell, 2004. **117**(5): p. 625-35.
156. Moon, J.C., et al., *Oxidative stress-dependent structural and functional switching of a human 2-Cys peroxiredoxin isotype II that enhances HeLa cell resistance to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cell death*. J Biol Chem, 2005. **280**(31): p. 28775-84.
157. Jang, H.H., et al., *Phosphorylation and concomitant structural changes in human 2-Cys peroxiredoxin isotype I differentially regulate its peroxidase and molecular chaperone functions*. FEBS Lett, 2006. **580**(1): p. 351-5.
158. Parsonage, D., et al., *Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin*. Biochemistry, 2005. **44**(31): p. 10583-92.
159. Yang, K.S., et al., *Inactivation of human peroxiredoxin I during catalysis as the result of the oxidation of the catalytic site cysteine to cysteine-sulfinic acid*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38029-36.
160. Cao, J., et al., *Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity*. EMBO J, 2009. **28**(10): p. 1505-17.
161. Lim, J.C., et al., *Irreversible oxidation of the active-site cysteine of peroxiredoxin to cysteine sulfonic acid for enhanced molecular chaperone activity*. J Biol Chem, 2008. **283**(43): p. 28873-80.
162. Rhee, S.G., et al., *Sulfiredoxin, the cysteine sulfinic acid reductase specific to 2-Cys peroxiredoxin: its discovery, mechanism of action, and biological significance*. Kidney Int Suppl, 2007(106): p. S3-8.
163. Mu, Z.M., X.Y. Yin, and E.V. Prochownik, *Pag, a putative tumor suppressor, interacts with the Myc Box II domain of c-Myc and selectively alters its biological function and target gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(45): p. 43175-84.
164. Kim, J.H., et al., *RNA-binding properties and RNA chaperone activity of human peroxiredoxin 1*. Biochem Biophys Res Commun, 2012. **425**(4): p. 730-4.
165. Jarvis, R.M., S.M. Hughes, and E.C. Ledgerwood, *Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells*. Free Radic Biol Med, 2012. **53**(7): p. 1522-30.
166. Kim, S.Y., T.J. Kim, and K.Y. Lee, *A novel function of peroxiredoxin 1 (Prx-1) in apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1)-mediated signaling pathway*. FEBS Lett, 2008. **582**(13): p. 1913-8.
167. Turner-Ivey, B., et al., *Role for Prdx1 as a specific sensor in redox-regulated senescence in breast cancer*. Oncogene, 2013. **32**(45): p. 5302-14.
168. Veal, E.A., et al., *A 2-Cys peroxiredoxin regulates peroxide-induced oxidation and activation of a stress-activated MAP kinase*. Mol Cell, 2004. **15**(1): p. 129-39.
169. Woo, H.A., et al., *Reversing the inactivation of peroxiredoxins caused by cysteine sulfinic acid formation*. Science, 2003. **300**(5619): p. 653-6.
170. Biteau, B., J. Labarre, and M.B. Toledano, *ATP-dependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin*. Nature, 2003. **425**(6961): p. 980-4.
171. Mikkelsen, T., et al., *Temozolomide single-agent chemotherapy for newly diagnosed anaplastic oligodendroglioma*. J Neurooncol, 2009. **92**(1): p. 57-63.
172. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
173. Stupp, R., et al., *Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial*. Lancet Oncol, 2009. **10**(5): p. 459-66.
174. Hegi, M.E., et al., *Correlation of O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate MGMT activity*. J Clin Oncol, 2008. **26**(25): p. 4189-99.

175. Tran, A.N., et al., *Increased sensitivity to radiochemotherapy in IDH1 mutant glioblastoma as demonstrated by serial quantitative MR volumetry*. *Neuro Oncol*, 2014. **16**(3): p. 414-20.
176. Montano, N., et al., *Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited*. *Neoplasia*, 2011. **13**(12): p. 1113-21.
177. Sanson, M., J. Thillet, and K. Hoang-Xuan, *Molecular changes in gliomas*. *Curr Opin Oncol*, 2004. **16**(6): p. 607-13.
178. de Groot, J.F. and M.R. Gilbert, *New molecular targets in malignant gliomas*. *Curr Opin Neurol*, 2007. **20**(6): p. 712-8.
179. Eller, J.L., et al., *Activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody C225 against glioblastoma multiforme*. *Neurosurgery*, 2002. **51**(4): p. 1005-13; discussion 1013-4.
180. Combs, S.E., et al., *Treatment of primary glioblastoma multiforme with cetuximab, radiotherapy and temozolomide (GERT)--phase I/II trial: study protocol*. *BMC Cancer*, 2006. **6**: p. 133.
181. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
182. Sandler, A., et al., *Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer*. *N Engl J Med*, 2006. **355**(24): p. 2542-50.
183. Ferrara, N., et al., *Discovery and development of bevacizumab, an anti-VEGF antibody for treating cancer*. *Nat Rev Drug Discov*, 2004. **3**(5): p. 391-400.
184. Narayana, A., et al., *Feasibility of using bevacizumab with radiation therapy and temozolomide in newly diagnosed high-grade glioma*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 2008. **72**(2): p. 383-9.
185. Jane, E.P., D.R. Premkumar, and I.F. Pollack, *Coadministration of sorafenib with rottlerin potently inhibits cell proliferation and migration in human malignant glioma cells*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **319**(3): p. 1070-80.
186. de Bouard, S., et al., *Antiangiogenic and anti-invasive effects of sunitinib on experimental human glioblastoma*. *Neuro Oncol*, 2007. **9**(4): p. 412-23.
187. Batchelor, T.T., et al., *AZD2171, a pan-VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor, normalizes tumor vasculature and alleviates edema in glioblastoma patients*. *Cancer Cell*, 2007. **11**(1): p. 83-95.
188. Brown, P.D., et al., *Phase I/II trial of erlotinib and temozolomide with radiation therapy in the treatment of newly diagnosed glioblastoma multiforme: North Central Cancer Treatment Group Study N0177*. *J Clin Oncol*, 2008. **26**(34): p. 5603-9.
189. Rich, J.N., et al., *Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma*. *J Clin Oncol*, 2004. **22**(1): p. 133-42.
190. Raizer, J.J., et al., *A phase II trial of erlotinib in patients with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy*. *Neuro Oncol*, 2010. **12**(1): p. 95-103.
191. van den Bent, M.J., et al., *Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1268-74.
192. Samstag, Y., et al., *Actin cytoskeletal dynamics in T lymphocyte activation and migration*. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(1): p. 30-48.
193. Gunning, P.W., et al., *The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments*. *J Cell Sci*, 2015. **128**(11): p. 2009-19.
194. Nurnberg, A., T. Kitzing, and R. Grosse, *Nucleating actin for invasion*. *Nat Rev Cancer*, 2011. **11**(3): p. 177-87.
195. Bugyi, B. and M.F. Carlier, *Control of actin filament treadmilling in cell motility*. *Annu Rev Biophys*, 2010. **39**: p. 449-70.
196. Welch, M.D. and M. Way, *Arp2/3-mediated actin-based motility: a tail of pathogen abuse*. *Cell Host Microbe*, 2013. **14**(3): p. 242-55.
197. Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard, *The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(11): p. 6181-6.

198. Beltzner, C.C. and T.D. Pollard, *Pathway of actin filament branch formation by Arp2/3 complex*. J Biol Chem, 2008. **283**(11): p. 7135-44.
199. Pollard, T.D., *Regulation of actin filament assembly by Arp2/3 complex and formins*. Annu Rev Biophys Biomol Struct, 2007. **36**: p. 451-77.
200. Jansen, S., et al., *Mechanism of actin filament bundling by fascin*. J Biol Chem, 2011. **286**(34): p. 30087-96.
201. Djuzenova, C.S., et al., *Actin cytoskeleton organization, cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status*. Exp Cell Res, 2015. **330**(2): p. 346-57.
202. Tojkander, S., G. Gateva, and P. Lappalainen, *Actin stress fibers--assembly, dynamics and biological roles*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 8): p. 1855-64.
203. Hotulainen, P. and P. Lappalainen, *Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells*. J Cell Biol, 2006. **173**(3): p. 383-94.
204. Pollard, T.D. and G.G. Borisy, *Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments*. Cell, 2003. **112**(4): p. 453-65.
205. Dominguez, R. and K.C. Holmes, *Actin structure and function*. Annu Rev Biophys, 2011. **40**: p. 169-86.
206. Safer, D., M. Elzinga, and V.T. Nachmias, *Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable*. J Biol Chem, 1991. **266**(7): p. 4029-32.
207. Pollard, T.D., *Actin-binding protein evolution*. Nature, 1984. **312**(5993): p. 403.
208. Kovar, D.R., et al., *Control of the assembly of ATP- and ADP-actin by formins and profilin*. Cell, 2006. **124**(2): p. 423-35.
209. Veltman, D.M. and R.H. Insall, *WASP family proteins: their evolution and its physiological implications*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(16): p. 2880-93.
210. Hitchcock-DeGregori, S.E., *Now, swing your partner! 3D-domain switching of WASP activates Arp2/3 complex*. Nat Struct Biol, 2003. **10**(8): p. 583-4.
211. Raftopoulou, M. and A. Hall, *Cell migration: Rho GTPases lead the way*. Dev Biol, 2004. **265**(1): p. 23-32.
212. Huang, W., et al., *mTORC2 controls actin polymerization required for consolidation of long-term memory*. Nat Neurosci, 2013. **16**(4): p. 441-8.
213. Takeya, R. and H. Sumimoto, *Fhos, a mammalian formin, directly binds to F-actin via a region N-terminal to the FH1 domain and forms a homotypic complex via the FH2 domain to promote actin fiber formation*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 22): p. 4567-75.
214. Kovar, D.R., et al., *The fission yeast cytokinesis formin Cdc12p is a barbed end actin filament capping protein gated by profilin*. J Cell Biol, 2003. **161**(5): p. 875-87.
215. Romero, S., et al., *Formin is a processive motor that requires profilin to accelerate actin assembly and associated ATP hydrolysis*. Cell, 2004. **119**(3): p. 419-29.
216. Shekhar, S., et al., *Formin and capping protein together embrace the actin filament in a menage a trois*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 8730.
217. Samstag, Y., I. John, and G.H. Wabnitz, *Cofilin: a redox sensitive mediator of actin dynamics during T-cell activation and migration*. Immunol Rev, 2013. **256**(1): p. 30-47.
218. Lee, C.W., et al., *Dynamic localization of G-actin during membrane protrusion in neuronal motility*. Curr Biol, 2013. **23**(12): p. 1046-56.
219. Gunnersen, J.M., et al., *Growth and migration markers of rat C6 glioma cells identified by serial analysis of gene expression*. Glia, 2000. **32**(2): p. 146-54.
220. Yap, C.T., et al., *The motility of glioblastoma tumour cells is modulated by intracellular cofilin expression in a concentration-dependent manner*. Cell Motil Cytoskeleton, 2005. **60**(3): p. 153-65.
221. Bamburg, J.R. and B.W. Bernstein, *Roles of ADF/cofilin in actin polymerization and beyond*. F1000 Biol Rep, 2010. **2**: p. 62.
222. Lee, Y.J., et al., *Inhibition of invasiveness of human lung cancer cell line H1299 by over-expression of cofilin*. Cell Biol Int, 2005. **29**(11): p. 877-83.
223. Arber, S., et al., *Regulation of actin dynamics through phosphorylation of cofilin by LIM-kinase*. Nature, 1998. **393**(6687): p. 805-9.

224. Nagano, M., et al., *Turnover of focal adhesions and cancer cell migration*. Int J Cell Biol, 2012. **2012**: p. 310616.
225. Ridley, A.J. and A. Hall, *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell, 1992. **70**(3): p. 389-99.
226. Hotchin, N.A. and A. Hall, *The assembly of integrin adhesion complexes requires both extracellular matrix and intracellular rho/rac GTPases*. J Cell Biol, 1995. **131**(6 Pt 2): p. 1857-65.
227. Nobes, C.D. and A. Hall, *Rho, rac and cdc42 GTPases: regulators of actin structures, cell adhesion and motility*. Biochem Soc Trans, 1995. **23**(3): p. 456-9.
228. Chrzanowska-Wodnicka, M. and K. Burridge, *Rho-stimulated contractility drives the formation of stress fibers and focal adhesions*. J Cell Biol, 1996. **133**(6): p. 1403-15.
229. Thiagarajan, V., M.J. Tsai, and C.F. Weng, *Antroquinonol Targets FAK-Signaling Pathway Suppressed Cell Migration, Invasion, and Tumor Growth of C6 Glioma*. PLoS One, 2015. **10**(10): p. e0141285.
230. Ilic, D., et al., *Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice*. Nature, 1995. **377**(6549): p. 539-44.
231. Schaller, M.D. and J.T. Parsons, *Focal adhesion kinase and associated proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1994. **6**(5): p. 705-10.
232. Hildebrand, J.D., M.D. Schaller, and J.T. Parsons, *Paxillin, a tyrosine phosphorylated focal adhesion-associated protein binds to the carboxyl terminal domain of focal adhesion kinase*. Mol Biol Cell, 1995. **6**(6): p. 637-47.
233. Polte, T.R. and S.K. Hanks, *Interaction between focal adhesion kinase and Crk-associated tyrosine kinase substrate p130Cas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(23): p. 10678-82.
234. Nakamoto, T., et al., *Requirements for localization of p130cas to focal adhesions*. Mol Cell Biol, 1997. **17**(7): p. 3884-97.
235. Turner, C.E., *Paxillin and focal adhesion signalling*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(12): p. E231-6.
236. Calalb, M.B., T.R. Polte, and S.K. Hanks, *Tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase at sites in the catalytic domain regulates kinase activity: a role for Src family kinases*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(2): p. 954-63.
237. Schlaepfer, D.D., et al., *Integrin-mediated signal transduction linked to Ras pathway by GRB2 binding to focal adhesion kinase*. Nature, 1994. **372**(6508): p. 786-91.
238. Calalb, M.B., et al., *Focal adhesion kinase tyrosine-861 is a major site of phosphorylation by Src*. Biochem Biophys Res Commun, 1996. **228**(3): p. 662-8.
239. Schlaepfer, D.D. and T. Hunter, *Integrin signalling and tyrosine phosphorylation: just the FAKs?* Trends Cell Biol, 1998. **8**(4): p. 151-7.
240. Katz, B.Z., et al., *Targeting membrane-localized focal adhesion kinase to focal adhesions: roles of tyrosine phosphorylation and SRC family kinases*. J Biol Chem, 2003. **278**(31): p. 29115-20.
241. Kwong, L., et al., *R-Ras promotes focal adhesion formation through focal adhesion kinase and p130(Cas) by a novel mechanism that differs from integrins*. Mol Cell Biol, 2003. **23**(3): p. 933-49.
242. Wennerberg, K., et al., *The cytoplasmic tyrosines of integrin subunit beta1 are involved in focal adhesion kinase activation*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(15): p. 5758-65.
243. Angers-Loustau, A., et al., *Protein tyrosine phosphatase-PEST regulates focal adhesion disassembly, migration, and cytokinesis in fibroblasts*. J Cell Biol, 1999. **144**(5): p. 1019-31.
244. Garton, A.J. and N.K. Tonks, *Regulation of fibroblast motility by the protein tyrosine phosphatase PTP-PEST*. J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3811-8.
245. Bellis, S.L., J.T. Miller, and C.E. Turner, *Characterization of tyrosine phosphorylation of paxillin in vitro by focal adhesion kinase*. J Biol Chem, 1995. **270**(29): p. 17437-41.
246. Schaller, M.D. and J.T. Parsons, *pp125FAK-dependent tyrosine phosphorylation of paxillin creates a high-affinity binding site for Crk*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(5): p. 2635-45.

247. Nakamura, K., et al., *Tyrosine phosphorylation of paxillin alpha is involved in temporospatial regulation of paxillin-containing focal adhesion formation and F-actin organization in motile cells*. J Biol Chem, 2000. **275**(35): p. 27155-64.
248. Jiang, G., et al., *Two-piconewton slip bond between fibronectin and the cytoskeleton depends on talin*. Nature, 2003. **424**(6946): p. 334-7.
249. Priddle, H., et al., *Disruption of the talin gene compromises focal adhesion assembly in undifferentiated but not differentiated embryonic stem cells*. J Cell Biol, 1998. **142**(4): p. 1121-33.
250. Giannone, G., et al., *Talin1 is critical for force-dependent reinforcement of initial integrin-cytoskeleton bonds but not tyrosine kinase activation*. J Cell Biol, 2003. **163**(2): p. 409-19.
251. Izard, T. and C. Vonnrhein, *Structural basis for amplifying vinculin activation by talin*. J Biol Chem, 2004. **279**(26): p. 27667-78.
252. Pavlyk, I., et al., *Arginine deprivation affects glioblastoma cell adhesion, invasiveness and actin cytoskeleton organization by impairment of beta-actin arginylation*. Amino Acids, 2015. **47**(1): p. 199-212.
253. Hu, Y.L., et al., *FAK and paxillin dynamics at focal adhesions in the protrusions of migrating cells*. Sci Rep, 2014. **4**: p. 6024.
254. Rottner, K., A. Hall, and J.V. Small, *Interplay between Rac and Rho in the control of substrate contact dynamics*. Curr Biol, 1999. **9**(12): p. 640-8.
255. Ballestrem, C., et al., *Marching at the front and dragging behind: differential alphaVbeta3-integrin turnover regulates focal adhesion behavior*. J Cell Biol, 2001. **155**(7): p. 1319-32.
256. Kiosses, W.B., et al., *Rac recruits high-affinity integrin alphavbeta3 to lamellipodia in endothelial cell migration*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 316-20.
257. Edlund, M., M.A. Lotano, and C.A. Otey, *Dynamics of alpha-actinin in focal adhesions and stress fibers visualized with alpha-actinin-green fluorescent protein*. Cell Motil Cytoskeleton, 2001. **48**(3): p. 190-200.
258. Laukaitis, C.M., et al., *Differential dynamics of alpha 5 integrin, paxillin, and alpha-actinin during formation and disassembly of adhesions in migrating cells*. J Cell Biol, 2001. **153**(7): p. 1427-40.
259. Zaidel-Bar, R., et al., *Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells*. J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 22): p. 4605-13.
260. Wehrle-Haller, B. and B.A. Imhof, *Actin, microtubules and focal adhesion dynamics during cell migration*. Int J Biochem Cell Biol, 2003. **35**(1): p. 39-50.
261. DeMali, K.A., C.A. Barlow, and K. Burridge, *Recruitment of the Arp2/3 complex to vinculin: coupling membrane protrusion to matrix adhesion*. J Cell Biol, 2002. **159**(5): p. 881-91.
262. Parsons, J.T. and S.J. Parsons, *Src family protein tyrosine kinases: cooperating with growth factor and adhesion signaling pathways*. Curr Opin Cell Biol, 1997. **9**(2): p. 187-92.
263. Bhatt, A., et al., *Regulation of focal complex composition and disassembly by the calcium-dependent protease calpain*. J Cell Sci, 2002. **115**(Pt 17): p. 3415-25.
264. Han, J., et al., *A MAP kinase targeted by endotoxin and hyperosmolarity in mammalian cells*. Science, 1994. **265**(5173): p. 808-11.
265. Tudor, C., et al., *The p38 MAPK pathway inhibits tristetraproline-directed decay of interleukin-10 and pro-inflammatory mediator mRNAs in murine macrophages*. FEBS Lett, 2009. **583**(12): p. 1933-8.
266. Fortin Ensign, S.P., et al., *Implications of Rho GTPase Signaling in Glioma Cell Invasion and Tumor Progression*. Front Oncol, 2013. **3**: p. 241.
267. Cingolani, L.A. and Y. Goda, *Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy*. Nat Rev Neurosci, 2008. **9**(5): p. 344-56.
268. Huang, C., K. Jacobson, and M.D. Schaller, *MAP kinases and cell migration*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 20): p. 4619-28.
269. Wagner, E.F. and A.R. Nebreda, *Signal integration by JNK and p38 MAPK pathways in cancer development*. Nat Rev Cancer, 2009. **9**(8): p. 537-49.

270. Singh, S., et al., *Identification of the p16-Arc subunit of the Arp 2/3 complex as a substrate of MAPK-activated protein kinase 2 by proteomic analysis*. J Biol Chem, 2003. **278**(38): p. 36410-7.
271. Werz, O., et al., *5-lipoxygenase is phosphorylated by p38 kinase-dependent MAPKAP kinases*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(10): p. 5261-6.
272. Hedges, J.C., et al., *A role for p38(MAPK)/HSP27 pathway in smooth muscle cell migration*. J Biol Chem, 1999. **274**(34): p. 24211-9.
273. Bix, G., et al., *Endorepellin causes endothelial cell disassembly of actin cytoskeleton and focal adhesions through alpha2beta1 integrin*. J Cell Biol, 2004. **166**(1): p. 97-109.
274. Lee, J.W., et al., *HSP27 regulates cell adhesion and invasion via modulation of focal adhesion kinase and MMP-2 expression*. Eur J Cell Biol, 2008. **87**(6): p. 377-87.
275. George, M.D., et al., *p38 mitogen-activated protein kinase interacts with vinculin at focal adhesions during fatty acid-stimulated cell adhesion*. Biochem Cell Biol, 2013. **91**(6): p. 404-18.
276. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 vols.
277. Ausubel, F.M., *Current Protocols in Molecular Biology*. 1987, N.Y.: John Wiley & Sons. nicht durchgehend paginiert.
278. Branle, F., et al., *Evaluation of the efficiency of chemotherapy in in vivo orthotopic models of human glioma cells with and without 1p19q deletions and in C6 rat orthotopic allografts serving for the evaluation of surgery combined with chemotherapy*. Cancer, 2002. **95**(3): p. 641-55.
279. Parr, T.R., Jr. and L.E. Bryan, *Mechanism of resistance of an ampicillin-resistant, beta-lactamase-negative clinical isolate of Haemophilus influenzae type b to beta-lactam antibiotics*. Antimicrob Agents Chemother, 1984. **25**(6): p. 747-53.
280. Vara, J., J.A. Perez-Gonzalez, and A. Jimenez, *Biosynthesis of puromycin by Streptomyces alboniger: characterization of puromycin N-acetyltransferase*. Biochemistry, 1985. **24**(27): p. 8074-81.
281. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Design and cloning of lentiviral vectors expressing small interfering RNAs*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 234-40.
282. Stewart, S.A., et al., *Lentivirus-delivered stable gene silencing by RNAi in primary cells*. RNA, 2003. **9**(4): p. 493-501.
283. Xia, X.G., et al., *An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA*. Nucleic Acids Res, 2003. **31**(17): p. e100.
284. Zufferey, R., et al., *Woodchuck hepatitis virus posttranscriptional regulatory element enhances expression of transgenes delivered by retroviral vectors*. J Virol, 1999. **73**(4): p. 2886-92.
285. Barrow, K.M., F.M. Perez-Campo, and C.M. Ward, *Use of the cytomegalovirus promoter for transient and stable transgene expression in mouse embryonic stem cells*. Methods Mol Biol, 2006. **329**: p. 283-94.
286. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
287. Castro-Chavez, F., *The rules of variation: amino acid exchange according to the rotating circular genetic code*. J Theor Biol, 2010. **264**(3): p. 711-21.
288. Lehman, I.R., *DNA ligase: structure, mechanism, and function*. Science, 1974. **186**(4166): p. 790-7.
289. Inoue, H., H. Nojima, and H. Okayama, *High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids*. Gene, 1990. **96**(1): p. 23-8.
290. Tiscornia, G., O. Singer, and I.M. Verma, *Production and purification of lentiviral vectors*. Nat Protoc, 2006. **1**(1): p. 241-5.
291. Heid, C.A., et al., *Real time quantitative PCR*. Genome Res, 1996. **6**(10): p. 986-94.
292. Nazarenko, I.A., S.K. Bhatnagar, and R.J. Hohman, *A closed tube format for amplification and detection of DNA based on energy transfer*. Nucleic Acids Res, 1997. **25**(12): p. 2516-21.



293. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(9): p. e45.
294. Boratyn, G.M., et al., *BLAST: a more efficient report with usability improvements*. Nucleic Acids Res, 2013. **41**(Web Server issue): p. W29-33.
295. Sennepin, A.D., et al., *Multiple reprobing of Western blots after inactivation of peroxidase activity by its substrate, hydrogen peroxide*. Anal Biochem, 2009. **393**(1): p. 129-31.
296. Liang, C.C., A.Y. Park, and J.L. Guan, *In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro*. Nat Protoc, 2007. **2**(2): p. 329-33.
297. Schindelin, J., et al., *Fiji: an open-source platform for biological-image analysis*. Nat Methods, 2012. **9**(7): p. 676-82.
298. Goncharova, E.A., D.A. Goncharov, and V.P. Krymskaya, *Assays for in vitro monitoring of human airway smooth muscle (ASM) and human pulmonary arterial vascular smooth muscle (VSM) cell migration*. Nat Protoc, 2006. **1**(6): p. 2933-9.
299. Valster, A., et al., *Cell migration and invasion assays*. Methods, 2005. **37**(2): p. 208-15.
300. Limame, R., et al., *Comparative analysis of dynamic cell viability, migration and invasion assessments by novel real-time technology and classic endpoint assays*. PLoS One, 2012. **7**(10): p. e46536.
301. Rehm, H. and T. Letzel, *Der Experimentator: Proteinbiochemie, Proteomics*. 6. Aufl. ed. Der Experimentator. 2010, Heidelberg: Spektrum Akad. Verl. Online-Ressource.
302. Cooper, J.A., *Effects of cytochalasin and phalloidin on actin*. J Cell Biol, 1987. **105**(4): p. 1473-8.
303. Riedl, J., et al., *Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin*. Nat Methods, 2008. **5**(7): p. 605-7.
304. Diener, A., et al., *Control of focal adhesion dynamics by material surface characteristics*. Biomaterials, 2005. **26**(4): p. 383-92.
305. Millon-Fremillon, A., et al., *Cell adaptive response to extracellular matrix density is controlled by ICAP-1-dependent beta1-integrin affinity*. J Cell Biol, 2008. **180**(2): p. 427-41.
306. Schiefermeier, N., et al., *The late endosomal p14-MP1 (LAMTOR2/3) complex regulates focal adhesion dynamics during cell migration*. J Cell Biol, 2014. **205**(4): p. 525-40.
307. Lamoral-Theys, D., et al., *Long-term temozolomide treatment induces marked amino metabolism modifications and an increase in TMZ sensitivity in Hs683 oligodendroglioma cells*. Neoplasia, 2010. **12**(1): p. 69-79.
308. Smith, T.H., et al., *An in-vitro preparation of isolated enteric neurons and glia from the myenteric plexus of the adult mouse*. J Vis Exp, 2013(78).
309. Li, J.Y., et al., *Anisomycin induces glioma cell death via down-regulation of PP2A catalytic subunit in vitro*. Acta Pharmacol Sin, 2012. **33**(7): p. 935-40.
310. Kumar, S., et al., *Pyridinylimidazole compound SB 203580 inhibits the activity but not the activation of p38 mitogen-activated protein kinase*. Biochem Biophys Res Commun, 1999. **263**(3): p. 825-31.
311. Liu, C.X., et al., *Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells*. Nat Chem Biol, 2012. **8**(5): p. 486-93.
312. Hazzalin, C.A., et al., *Anisomycin selectively desensitizes signalling components involved in stress kinase activation and fos and jun induction*. Mol Cell Biol, 1998. **18**(4): p. 1844-54.
313. De Simoni, A. and L.M. Yu, *Preparation of organotypic hippocampal slice cultures: interface method*. Nat Protoc, 2006. **1**(3): p. 1439-45.
314. Aaberg-Jessen, C., et al., *Invasion of primary glioma- and cell line-derived spheroids implanted into corticostriatal slice cultures*. Int J Clin Exp Pathol, 2013. **6**(4): p. 546-60.
315. Timmins, N.E. and L.K. Nielsen, *Generation of multicellular tumor spheroids by the hanging-drop method*. Methods Mol Med, 2007. **140**: p. 141-51.

316. Poh, Y.C., et al., *Generation of organized germ layers from a single mouse embryonic stem cell*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4000.
317. Grollman, A.P., *Inhibitors of protein biosynthesis. II. Mode of action of anisomycin*. J Biol Chem, 1967. **242**(13): p. 3226-33.
318. Ling, V., *Multidrug resistance: molecular mechanisms and clinical relevance*. Cancer Chemother Pharmacol, 1997. **40 Suppl**: p. S3-8.
319. Hollo, Z., et al., *Calcein accumulation as a fluorometric functional assay of the multidrug transporter*. Biochim Biophys Acta, 1994. **1191**(2): p. 384-8.
320. Jiang, H., et al., *Polysomy of chromosomes 1 and 19: an underestimated prognostic factor in oligodendrogial tumors*. J Neurooncol, 2014. **120**(1): p. 131-8.
321. Jiang, H., et al., *1p/19q-driven prognostic molecular classification for high-grade oligodendrogial tumors*. J Neurooncol, 2014. **120**(3): p. 607-14.
322. Cai, C.Y., et al., *Expression and clinical value of peroxiredoxin-1 in patients with pancreatic cancer*. Eur J Surg Oncol, 2015. **41**(2): p. 228-35.
323. Riddell, J.R., et al., *Peroxiredoxin 1 controls prostate cancer growth through Toll-like receptor 4-dependent regulation of tumor vasculature*. Cancer Res, 2011. **71**(5): p. 1637-46.
324. Kim, J.H., et al., *Up-regulation of peroxiredoxin 1 in lung cancer and its implication as a prognostic and therapeutic target*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(8): p. 2326-33.
325. Chang, J.W., et al., *Augmented expression of peroxiredoxin I in lung cancer*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **289**(2): p. 507-12.
326. Li, J., et al., *ILK and PRDX1 are prognostic markers in squamous cell/adenosquamous carcinomas and adenocarcinoma of gallbladder*. Tumour Biol, 2013. **34**(1): p. 359-68.
327. Trono, D., *Lentiviral vectors*. Current topics in microbiology and immunology. 2002, Berlin: Springer. 258 S.
328. Zufferey, R., et al., *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery*. J Virol, 1998. **72**(12): p. 9873-80.
329. Denli, A.M. and G.J. Hannon, *RNAi: an ever-growing puzzle*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(4): p. 196-201.
330. Kumar, M., et al., *Systematic determination of the packaging limit of lentiviral vectors*. Hum Gene Ther, 2001. **12**(15): p. 1893-905.
331. Mathews, M.B. and T. Shenk, *Adenovirus virus-associated RNA and translation control*. J Virol, 1991. **65**(11): p. 5657-62.
332. Khan, K.H., *Gene expression in Mammalian cells and its applications*. Adv Pharm Bull, 2013. **3**(2): p. 257-63.
333. Cerutti, H. and J.A. Casas-Mollano, *On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man*. Curr Genet, 2006. **50**(2): p. 81-99.
334. Siomi, H. and M.C. Siomi, *On the road to reading the RNA-interference code*. Nature, 2009. **457**(7228): p. 396-404.
335. Hannon, G.J., *RNA interference*. Nature, 2002. **418**(6894): p. 244-51.
336. Makinen, P.I., et al., *Stable RNA interference: comparison of U6 and H1 promoters in endothelial cells and in mouse brain*. J Gene Med, 2006. **8**(4): p. 433-41.
337. Stegmeier, F., et al., *A lentiviral microRNA-based system for single-copy polymerase II-regulated RNA interference in mammalian cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(37): p. 13212-7.
338. Vaucheret, H., *MicroRNA-dependent trans-acting siRNA production*. Sci STKE, 2005. **2005**(300): p. pe43.
339. McManus, M.T., et al., *Gene silencing using micro-RNA designed hairpins*. RNA, 2002. **8**(6): p. 842-50.
340. Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl, *RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs*. Genes Dev, 2001. **15**(2): p. 188-200.
341. Oliveira, D.M. and M.A. Goodell, *Transient RNA interference in hematopoietic progenitors with functional consequences*. Genesis, 2003. **36**(4): p. 203-8.
342. Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami, *A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells*. Science, 2002. **296**(5567): p. 550-3.

343. Tiscornia, G., et al., *A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(4): p. 1844-8.
344. Robinson, D.A., et al., *A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference*. Nat Genet, 2003. **33**(3): p. 401-6.
345. Paborsky, L.R., et al., *Mammalian cell transient expression of tissue factor for the production of antigen*. Protein Eng, 1990. **3**(6): p. 547-53.
346. O'Connell, M.R., et al., *Programmable RNA recognition and cleavage by CRISPR/Cas9*. Nature, 2014. **516**(7530): p. 263-6.
347. Nigro, J.M., et al., *Detection of 1p and 19q loss in oligodendroglioma by quantitative microsatellite analysis, a real-time quantitative polymerase chain reaction assay*. Am J Pathol, 2001. **158**(4): p. 1253-62.
348. Chaturvedi, A., et al., *Detection of 1p19q deletion by real-time comparative quantitative PCR*. Biomark Insights, 2012. **7**: p. 9-17.
349. Felsberg, J., et al., *DNA methylation and allelic losses on chromosome arm 14q in oligodendroglial tumours*. Neuropathol Appl Neurobiol, 2006. **32**(5): p. 517-24.
350. Reddy, K.S., *Assessment of 1p/19q deletions by fluorescence in situ hybridization in gliomas*. Cancer Genet Cytogenet, 2008. **184**(2): p. 77-86.
351. Kitange, G., et al., *Chromosomal imbalances detected by array comparative genomic hybridization in human oligodendrogliomas and mixed oligoastrocytomas*. Genes Chromosomes Cancer, 2005. **42**(1): p. 68-77.
352. Lin, C.J., et al., *Resveratrol enhances the therapeutic effect of temozolomide against malignant glioma in vitro and in vivo by inhibiting autophagy*. Free Radic Biol Med, 2012. **52**(2): p. 377-91.
353. Cipriani, G., et al., *Nuclear poly(ADP-ribose) polymerase-1 rapidly triggers mitochondrial dysfunction*. J Biol Chem, 2005. **280**(17): p. 17227-34.
354. Tada-Oikawa, S., et al., *Generation of hydrogen peroxide precedes loss of mitochondrial membrane potential during DNA alkylation-induced apoptosis*. FEBS Lett, 1999. **442**(1): p. 65-9.
355. Kuznetsov, A.V., et al., *Changes in mitochondrial redox state, membrane potential and calcium precede mitochondrial dysfunction in doxorubicin-induced cell death*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1813**(6): p. 1144-52.
356. Kim, E.H., et al., *CDDO-imidazolide induces DNA damage, G2/M arrest and apoptosis in BRCA1-mutated breast cancer cells*. Cancer Prev Res (Phila), 2011. **4**(3): p. 425-34.
357. Pak, J.H., et al., *Peroxiredoxin 6 overexpression attenuates cisplatin-induced apoptosis in human ovarian cancer cells*. Cancer Invest, 2011. **29**(1): p. 21-8.
358. Rajendran, S., et al., *The role of mitochondria in the radiation-induced bystander effect in human lymphoblastoid cells*. Radiat Res, 2011. **175**(2): p. 159-71.
359. Boonstra, J. and J.A. Post, *Molecular events associated with reactive oxygen species and cell cycle progression in mammalian cells*. Gene, 2004. **337**: p. 1-13.
360. Karlberg, I., et al., *Role of aerobic conditions in the control of cell proliferation*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1981. **65**(3): p. 250-6.
361. Rancourt, R.C., et al., *The role of p21(CIP1/WAF1) in growth of epithelial cells exposed to hyperoxia*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2001. **280**(4): p. L617-26.
362. Shenberger, J.S. and P.S. Dixon, *Oxygen induces S-phase growth arrest and increases p53 and p21(WAF1/CIP1) expression in human bronchial smooth-muscle cells*. Am J Respir Cell Mol Biol, 1999. **21**(3): p. 395-402.
363. Helt, C.E., et al., *p53-dependent induction of p21(Cip1/WAF1/Sdi1) protects against oxygen-induced toxicity*. Toxicol Sci, 2001. **63**(2): p. 214-22.
364. Thorn, T., et al., *Differences in activation of G2/M checkpoint in keratinocytes after genotoxic stress induced by hydrogen peroxide and ultraviolet A radiation*. Free Radic Res, 2001. **35**(4): p. 405-16.

365. Chung, Y.W., et al., *H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced AP-1 activation and its effect on p21(WAF1/CIP1)-mediated G2/M arrest in a p53-deficient human lung cancer cell*. Biochem Biophys Res Commun, 2002. **293**(4): p. 1248-53.
366. Gu, L., et al., *Deregulation of Cdc2 kinase induces caspase-3 activation and apoptosis*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **302**(2): p. 384-91.
367. Deng, Y.T., H.C. Huang, and J.K. Lin, *Rotenone induces apoptosis in MCF-7 human breast cancer cell-mediated ROS through JNK and p38 signaling*. Mol Carcinog, 2010. **49**(2): p. 141-51.
368. Chou, W.C., et al., *Arsenic suppresses gene expression in promyelocytic leukemia cells partly through Sp1 oxidation*. Blood, 2005. **106**(1): p. 304-10.
369. Ichijo, H., et al., *Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways*. Science, 1997. **275**(5296): p. 90-4.
370. Taniuchi, K., et al., *Peroxiredoxin 1 promotes pancreatic cancer cell invasion by modulating p38 MAPK activity*. Pancreas, 2015. **44**(2): p. 331-40.
371. Chorley, B.N., et al., *Identification of novel NRF2-regulated genes by ChIP-Seq: influence on retinoid X receptor alpha*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. 7416-29.
372. Alam, J., et al., *Mechanism of heme oxygenase-1 gene activation by cadmium in MCF-7 mammary epithelial cells. Role of p38 kinase and Nrf2 transcription factor*. J Biol Chem, 2000. **275**(36): p. 27694-702.
373. Yeh, C.T. and G.C. Yen, *Involvement of p38 MAPK and Nrf2 in phenolic acid-induced P-form phenol sulfotransferase expression in human hepatoma HepG2 cells*. Carcinogenesis, 2006. **27**(5): p. 1008-17.
374. Clark, A.R., J.L. Dean, and J. Saklatvala, *Post-transcriptional regulation of gene expression by mitogen-activated protein kinase p38*. FEBS Lett, 2003. **546**(1): p. 37-44.
375. Brook, M., et al., *Regulation of tumour necrosis factor alpha mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade*. FEBS Lett, 2000. **483**(1): p. 57-61.
376. Tao, R.R., et al., *Nitrosative stress induces peroxiredoxin 1 ubiquitination during ischemic insult via E6AP activation in endothelial cells both in vitro and in vivo*. Antioxid Redox Signal, 2014. **21**(1): p. 1-16.
377. Nasu, J., et al., *E6AP ubiquitin ligase mediates ubiquitin-dependent degradation of peroxiredoxin 1*. J Cell Biochem, 2010. **111**(3): p. 676-85.
378. Chan, A.L., et al., *c-Abl phosphorylates E6AP and regulates its E3 ubiquitin ligase activity*. Biochemistry, 2013. **52**(18): p. 3119-29.
379. Takeuchi, K., et al., *AMP-dependent kinase inhibits oxidative stress-induced caveolin-1 phosphorylation and endocytosis by suppressing the dissociation between c-Abl and Prdx1 proteins in endothelial cells*. J Biol Chem, 2013. **288**(28): p. 20581-91.
380. Sanchez-Prieto, R., et al., *Regulation of p73 by c-Abl through the p38 MAP kinase pathway*. Oncogene, 2002. **21**(6): p. 974-9.
381. O'Leary, P.C., et al., *Peroxiredoxin-1 protects estrogen receptor alpha from oxidative stress-induced suppression and is a protein biomarker of favorable prognosis in breast cancer*. Breast Cancer Res, 2014. **16**(4): p. R79.
382. Pichon, S., M. Bryckaert, and E. Berrou, *Control of actin dynamics by p38 MAP kinase - Hsp27 distribution in the lamellipodium of smooth muscle cells*. J Cell Sci, 2004. **117**(Pt 12): p. 2569-77.
383. Frame, M.C., *Src in cancer: deregulation and consequences for cell behaviour*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1602**(2): p. 114-30.
384. Munevar, S., Y.L. Wang, and M. Dembo, *Distinct roles of frontal and rear cell-substrate adhesions in fibroblast migration*. Mol Biol Cell, 2001. **12**(12): p. 3947-54.
385. Mohl, C., et al., *Quantitative mapping of averaged focal adhesion dynamics in migrating cells by shape normalization*. J Cell Sci, 2012. **125**(Pt 1): p. 155-65.
386. Kim, D.H. and D. Wirtz, *Focal adhesion size uniquely predicts cell migration*. FASEB J, 2013. **27**(4): p. 1351-61.
387. Osswald, M., et al., *Brain tumour cells interconnect to a functional and resistant network*. Nature, 2015. **528**(7580): p. 93-8.

388. Khalil, B.D., et al., *The regulation of RhoA at focal adhesions by StarD13 is important for astrocytoma cell motility*. Exp Cell Res, 2014. **321**(2): p. 109-22.
389. Fraley, S.I., et al., *A distinctive role for focal adhesion proteins in three-dimensional cell motility*. Nat Cell Biol, 2010. **12**(6): p. 598-604.
390. Sieg, D.J., C.R. Hauck, and D.D. Schlaepfer, *Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration*. J Cell Sci, 1999. **112 ( Pt 16)**: p. 2677-91.
391. Cukierman, E., R. Pankov, and K.M. Yamada, *Cell interactions with three-dimensional matrices*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(5): p. 633-9.
392. Cukierman, E., et al., *Taking cell-matrix adhesions to the third dimension*. Science, 2001. **294**(5547): p. 1708-12.
393. Vukicevic, S., et al., *Identification of multiple active growth factors in basement membrane Matrigel suggests caution in interpretation of cellular activity related to extracellular matrix components*. Exp Cell Res, 1992. **202**(1): p. 1-8.
394. Taub, M., et al., *Epidermal growth factor or transforming growth factor alpha is required for kidney tubulogenesis in matrigel cultures in serum-free medium*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(10): p. 4002-6.
395. Ruoslahti, E., *Brain extracellular matrix*. Glycobiology, 1996. **6**(5): p. 489-92.
396. Novak, U. and A.H. Kaye, *Extracellular matrix and the brain: components and function*. J Clin Neurosci, 2000. **7**(4): p. 280-90.
397. Lau, L.W., et al., *Pathophysiology of the brain extracellular matrix: a new target for remyelination*. Nat Rev Neurosci, 2013. **14**(10): p. 722-9.
398. Mueller, S.C., et al., *A novel protease-docking function of integrin at invadopodia*. J Biol Chem, 1999. **274**(35): p. 24947-52.
399. Dumin, J.A., et al., *Pro-collagenase-1 (matrix metalloproteinase-1) binds the alpha(2)beta(1) integrin upon release from keratinocytes migrating on type I collagen*. J Biol Chem, 2001. **276**(31): p. 29368-74.
400. Ellerbroek, S.M., et al., *Functional interplay between type I collagen and cell surface matrix metalloproteinase activity*. J Biol Chem, 2001. **276**(27): p. 24833-42.
401. Galvez, B.G., et al., *ECM regulates MT1-MMP localization with beta1 or alphavbeta3 integrins at distinct cell compartments modulating its internalization and activity on human endothelial cells*. J Cell Biol, 2002. **159**(3): p. 509-21.
402. Paulus, W., et al., *Diffuse brain invasion of glioma cells requires beta 1 integrins*. Lab Invest, 1996. **75**(6): p. 819-26.
403. Zamir, E., et al., *Dynamics and segregation of cell-matrix adhesions in cultured fibroblasts*. Nat Cell Biol, 2000. **2**(4): p. 191-6.
404. Itoh, K., et al., *An essential part for Rho-associated kinase in the transcellular invasion of tumor cells*. Nat Med, 1999. **5**(2): p. 221-5.
405. Kaneko, K., et al., *Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines*. Pancreas, 2002. **24**(1): p. 34-41.
406. Yoshioka, K., S. Nakamori, and K. Itoh, *Overexpression of small GTP-binding protein RhoA promotes invasion of tumor cells*. Cancer Res, 1999. **59**(8): p. 2004-10.
407. Sameni, M., J. Doseescu, and B.F. Sloane, *Imaging proteolysis by living human glioma cells*. Biol Chem, 2001. **382**(5): p. 785-8.
408. d'Ortho, M.P., et al., *MT1-MMP on the cell surface causes focal degradation of gelatin films*. FEBS Lett, 1998. **421**(2): p. 159-64.
409. Enterline, H.T. and D.R. Coman, *The ameboid motility of human and animal neoplastic cells*. Cancer, 1950. **3**(6): p. 1033-8.
410. Condeelis, J., J. Jones, and J.E. Segall, *Chemotaxis of metastatic tumor cells: clues to mechanisms from the Dictyostelium paradigm*. Cancer Metastasis Rev, 1992. **11**(1): p. 55-68.
411. Rintoul, R.C. and T. Sethi, *The role of extracellular matrix in small-cell lung cancer*. Lancet Oncol, 2001. **2**(7): p. 437-42.
412. Entschladen, F., et al., *Differential requirement of protein tyrosine kinases and protein kinase C in the regulation of T cell locomotion in three-dimensional collagen matrices*. J Immunol, 1997. **159**(7): p. 3203-10.

413. Ribic, A., et al., *Activity-dependent regulation of MHC class I expression in the developing primary visual cortex of the common marmoset monkey*. Behav Brain Funct, 2011. **7**: p. 1.
414. Kapitonov, D., et al., *Targeting sphingosine kinase 1 inhibits Akt signaling, induces apoptosis, and suppresses growth of human glioblastoma cells and xenografts*. Cancer Res, 2009. **69**(17): p. 6915-23.
415. Finkelstein, S.D., et al., *Histological characteristics and expression of acidic and basic fibroblast growth factor genes in intracerebral xenogeneic transplants of human glioma cells*. Neurosurgery, 1994. **34**(1): p. 136-43.
416. Watanabe, T., et al., *Promoter hypermethylation and homozygous deletion of the p14ARF and p16INK4a genes in oligodendrogliomas*. Acta Neuropathol, 2001. **101**(3): p. 185-9.
417. Benda, P., et al., *Differentiated rat glial cell strain in tissue culture*. Science, 1968. **161**(3839): p. 370-1.
418. Takizawa, S. and H. Nishihara, *Induction of tumors in the brain, kidney, and other extra-mammary gland organs by a continuous oral administration of N-nitrosobutylurea in Wistar-Furth rats*. Gan, 1971. **62**(6): p. 495-503.
419. Lindberg, N., et al., *Oligodendrocyte progenitor cells can act as cell of origin for experimental glioma*. Oncogene, 2009. **28**(23): p. 2266-75.
420. Hambardzumyan, D., et al., *Modeling Adult Gliomas Using RCAS/t-va Technology*. Transl Oncol, 2009. **2**(2): p. 89-95.
421. Hughes, S.H., et al., *Adaptor plasmids simplify the insertion of foreign DNA into helper-independent retroviral vectors*. J Virol, 1987. **61**(10): p. 3004-12.
422. Rousseau, A., et al., *Expression of oligodendroglial and astrocytic lineage markers in diffuse gliomas: use of YKL-40, ApoE, ASCL1, and NKX2-2*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(12): p. 1149-56.
423. Riemenschneider, M.J., T.H. Koy, and G. Reifenberger, *Expression of oligodendrocyte lineage genes in oligodendroglial and astrocytic gliomas*. Acta Neuropathol, 2004. **107**(3): p. 277-82.
424. Noh, D.Y., et al., *Overexpression of peroxiredoxin in human breast cancer*. Anticancer Res, 2001. **21**(3B): p. 2085-90.
425. Cha, M.K., K.H. Suh, and I.H. Kim, *Overexpression of peroxiredoxin I and thioredoxin1 in human breast carcinoma*. J Exp Clin Cancer Res, 2009. **28**: p. 93.
426. Sun, Y.L., et al., *Aberrant expression of peroxiredoxin 1 and its clinical implications in liver cancer*. World J Gastroenterol, 2015. **21**(38): p. 10840-52.
427. Jiang, B., et al., *Diterpenoids from Isodon adenantha*. J Nat Prod, 2002. **65**(8): p. 1111-6.
428. Soethoudt, M., et al., *Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling*. Free Radic Biol Med, 2014. **77**: p. 331-9.
429. Muchowicz, A., et al., *Adenanthin targets proteins involved in the regulation of disulphide bonds*. Biochem Pharmacol, 2014. **89**(2): p. 210-6.
430. Yin, Q.Q., et al., *Preventive and therapeutic effects of adenanthin on experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibiting NF-kappaB signaling*. J Immunol, 2013. **191**(5): p. 2115-25.
431. Hou, J.K., et al., *Adenanthin targets peroxiredoxin I/II to kill hepatocellular carcinoma cells*. Cell Death Dis, 2014. **5**: p. e1400.
432. Loureiro, S.O., et al., *Acute ethanol exposure disrupts actin cytoskeleton and generates reactive oxygen species in c6 cells*. Toxicol In Vitro, 2011. **25**(1): p. 28-36.
433. Alvord, E.C., Jr., *Conclusion: is myelin basic protein the right antigen and experimental allergic encephalomyelitis the right model for multiple sclerosis?* Prog Clin Biol Res, 1984. **146**: p. 503-8.
434. Xiong, J., et al., *[Loss of heterozygosity of chromosome 1p/19q and p53 protein expression in oligodendroglioma]*. Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi, 2009. **38**(7): p. 445-50.

435. Cairncross, J.G., et al., *Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(19): p. 1473-9.
436. Brat, D.J., et al., *Analysis of 1p, 19q, 9p, and 10q as prognostic markers for high-grade astrocytomas using fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays from Radiation Therapy Oncology Group trials*. Neuro Oncol, 2004. **6**(2): p. 96-103.
437. Cecchelli, R., et al., *Modelling of the blood-brain barrier in drug discovery and development*. Nat Rev Drug Discov, 2007. **6**(8): p. 650-61.
438. Abbott, N.J., L. Ronnback, and E. Hansson, *Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier*. Nat Rev Neurosci, 2006. **7**(1): p. 41-53.
439. Daneman, R., et al., *Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis*. Nature, 2010. **468**(7323): p. 562-6.
440. Obermeier, B., R. Daneman, and R.M. Ransohoff, *Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier*. Nat Med, 2013. **19**(12): p. 1584-96.
441. Alvarez, J.I., T. Katayama, and A. Prat, *Glial influence on the blood brain barrier*. Glia, 2013. **61**(12): p. 1939-58.
442. Juliano, R.L. and V. Ling, *A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants*. Biochim Biophys Acta, 1976. **455**(1): p. 152-62.
443. Cordon-Cardo, C., et al., *Multidrug-resistance gene (P-glycoprotein) is expressed by endothelial cells at blood-brain barrier sites*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1989. **86**(2): p. 695-8.
444. Schinkel, A.H., et al., *Disruption of the mouse mdr1a P-glycoprotein gene leads to a deficiency in the blood-brain barrier and to increased sensitivity to drugs*. Cell, 1994. **77**(4): p. 491-502.
445. Demeule, M., et al., *Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier*. Vascul Pharmacol, 2002. **38**(6): p. 339-48.
446. de Vries, N.A., et al., *P-glycoprotein and breast cancer resistance protein: two dominant transporters working together in limiting the brain penetration of topotecan*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(21): p. 6440-9.
447. Groothuis, D.R., P. Molnar, and R.G. Blasberg, *Regional blood flow and blood-to-tissue transport in five brain tumor models. Implications for chemotherapy*. Prog Exp Tumor Res, 1984. **27**: p. 132-53.
448. Watkins, S., et al., *Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells*. Nat Commun, 2014. **5**: p. 4196.
449. Raymond, J.J., D.M. Robertson, and H.B. Dinsdale, *Pharmacological modification of bradykinin induced breakdown of the blood-brain barrier*. Can J Neurol Sci, 1986. **13**(3): p. 214-20.
450. Machein, M.R., et al., *Vascular endothelial growth factor expression, vascular volume, and, capillary permeability in human brain tumors*. Neurosurgery, 1999. **44**(4): p. 732-40; discussion 740-1.
451. Dhermain, F.G., et al., *Advanced MRI and PET imaging for assessment of treatment response in patients with gliomas*. Lancet Neurol, 2010. **9**(9): p. 906-20.
452. Juillerat-Jeanneret, L., *The targeted delivery of cancer drugs across the blood-brain barrier: chemical modifications of drugs or drug-nanoparticles?* Drug Discov Today, 2008. **13**(23-24): p. 1099-106.
453. Korfel, A. and E. Thiel, *Targeted therapy and blood-brain barrier*. Recent Results Cancer Res, 2007. **176**: p. 123-33.
454. Polli, J.W., et al., *Rational use of in vitro P-glycoprotein assays in drug discovery*. J Pharmacol Exp Ther, 2001. **299**(2): p. 620-8.
455. Rautio, J., et al., *In vitro p-glycoprotein inhibition assays for assessment of clinical drug interaction potential of new drug candidates: a recommendation for probe substrates*. Drug Metab Dispos, 2006. **34**(5): p. 786-92.
456. Mahar Doan, K.M., et al., *Passive permeability and P-glycoprotein-mediated efflux differentiate central nervous system (CNS) and non-CNS marketed drugs*. J Pharmacol Exp Ther, 2002. **303**(3): p. 1029-37.

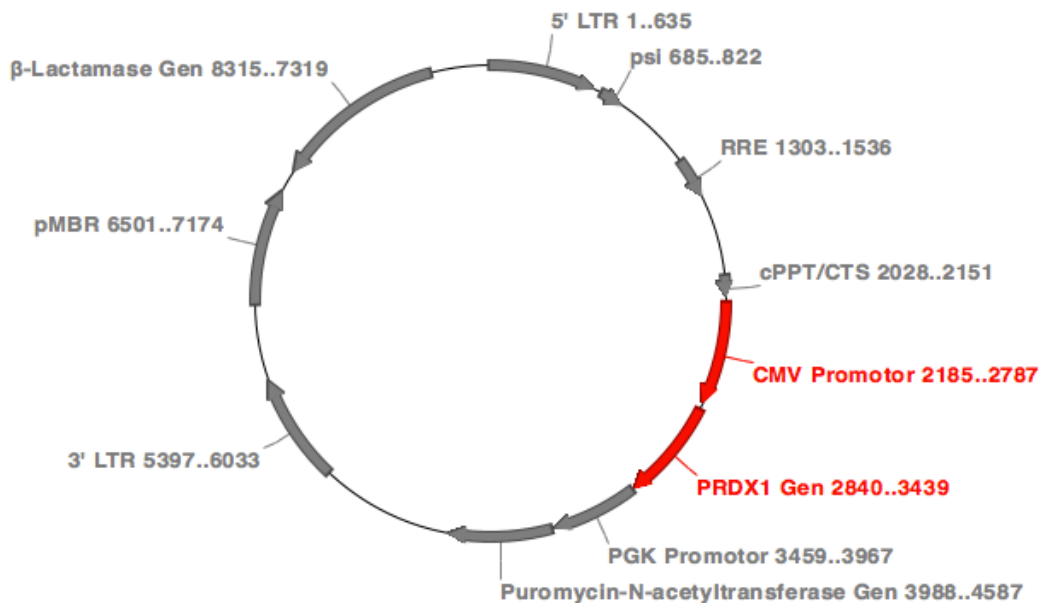
457. Siegal, T., et al., *In vivo* assessment of the window of barrier opening after osmotic blood-brain barrier disruption in humans. *J Neurosurg*, 2000. **92**(4): p. 599-605.
458. Elliott, P.J., et al., *Unlocking the blood-brain barrier: a role for RMP-7 in brain tumor therapy*. *Exp Neurol*, 1996. **141**(2): p. 214-24.
459. Inamura, T., et al., *Intracarotid infusion of RMP-7, a bradykinin analog: a method for selective drug delivery to brain tumors*. *J Neurosurg*, 1994. **81**(5): p. 752-8.
460. Prados, M.D., et al., *A randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 2 study of RMP-7 in combination with carboplatin administered intravenously for the treatment of recurrent malignant glioma*. *Neuro Oncol*, 2003. **5**(2): p. 96-103.
461. Fortin, D., et al., *Enhanced chemotherapy delivery by intraarterial infusion and blood-brain barrier disruption in malignant brain tumors: the Sherbrooke experience*. *Cancer*, 2005. **103**(12): p. 2606-15.
462. Burkhardt, J.K., et al., *Intra-arterial delivery of bevacizumab after blood-brain barrier disruption for the treatment of recurrent glioblastoma: progression-free survival and overall survival*. *World Neurosurg*, 2012. **77**(1): p. 130-4.
463. Lin, F., et al., *Targeting core (mutated) pathways of high-grade gliomas: challenges of intrinsic resistance and drug efflux*. *CNS Oncol*, 2013. **2**(3): p. 271-88.
464. de Bruin, M., et al., *Reversal of resistance by GF120918 in cell lines expressing the ABC half-transporter, MXR*. *Cancer Lett*, 1999. **146**(2): p. 117-26.
465. Bauer, M., et al., *Approaching complete inhibition of P-glycoprotein at the human blood-brain barrier: an (R)-[11C]verapamil PET study*. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2015. **35**(5): p. 743-6.
466. Bauer, M., et al., *Pgp-mediated interaction between (R)-[11C]verapamil and tariquidar at the human blood-brain barrier: a comparison with rat data*. *Clin Pharmacol Ther*, 2012. **91**(2): p. 227-33.
467. Choo, E.F., et al., *Differential in vivo sensitivity to inhibition of P-glycoprotein located in lymphocytes, testes, and the blood-brain barrier*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. **317**(3): p. 1012-8.
468. Kuntner, C., et al., *Dose-response assessment of tariquidar and elacridar and regional quantification of P-glycoprotein inhibition at the rat blood-brain barrier using (R)-[(11)C]verapamil PET*. *Eur J Nucl Med Mol Imaging*, 2010. **37**(5): p. 942-53.
469. Lagas, J.S., et al., *Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein limit sorafenib brain accumulation*. *Mol Cancer Ther*, 2010. **9**(2): p. 319-26.
470. Oberoi, R.K., R.K. Mittapalli, and W.F. Elmquist, *Pharmacokinetic assessment of efflux transport in sunitinib distribution to the brain*. *J Pharmacol Exp Ther*, 2013. **347**(3): p. 755-64.
471. Lin, F., et al., *ABCB1, ABCG2, and PTEN determine the response of glioblastoma to temozolomide and ABT-888 therapy*. *Clin Cancer Res*, 2014. **20**(10): p. 2703-13.
472. Sane, R., R.K. Mittapalli, and W.F. Elmquist, *Development and evaluation of a novel microemulsion formulation of elacridar to improve its bioavailability*. *J Pharm Sci*, 2013. **102**(4): p. 1343-54.
473. Drappatz, J., et al., *Phase I study of GRN1005 in recurrent malignant glioma*. *Clin Cancer Res*, 2013. **19**(6): p. 1567-76.
474. Pardridge, W.M. and R.J. Boado, *Reengineering biopharmaceuticals for targeted delivery across the blood-brain barrier*. *Methods Enzymol*, 2012. **503**: p. 269-92.
475. Che, C., et al., *New Angiopep-modified doxorubicin (ANG1007) and etoposide (ANG1009) chemotherapeutics with increased brain penetration*. *J Med Chem*, 2010. **53**(7): p. 2814-24.
476. Regina, A., et al., *ANG4043, a novel brain-penetrant peptide-mAb conjugate, is efficacious against HER2-positive intracranial tumors in mice*. *Mol Cancer Ther*, 2015. **14**(1): p. 129-40.
477. Allhenn, D., M.A. Boushehri, and A. Lamprecht, *Drug delivery strategies for the treatment of malignant gliomas*. *Int J Pharm*, 2012. **436**(1-2): p. 299-310.
478. Bidros, D.S., J.K. Liu, and M.A. Vogelbaum, *Future of convection-enhanced delivery in the treatment of brain tumors*. *Future Oncol*, 2010. **6**(1): p. 117-25.



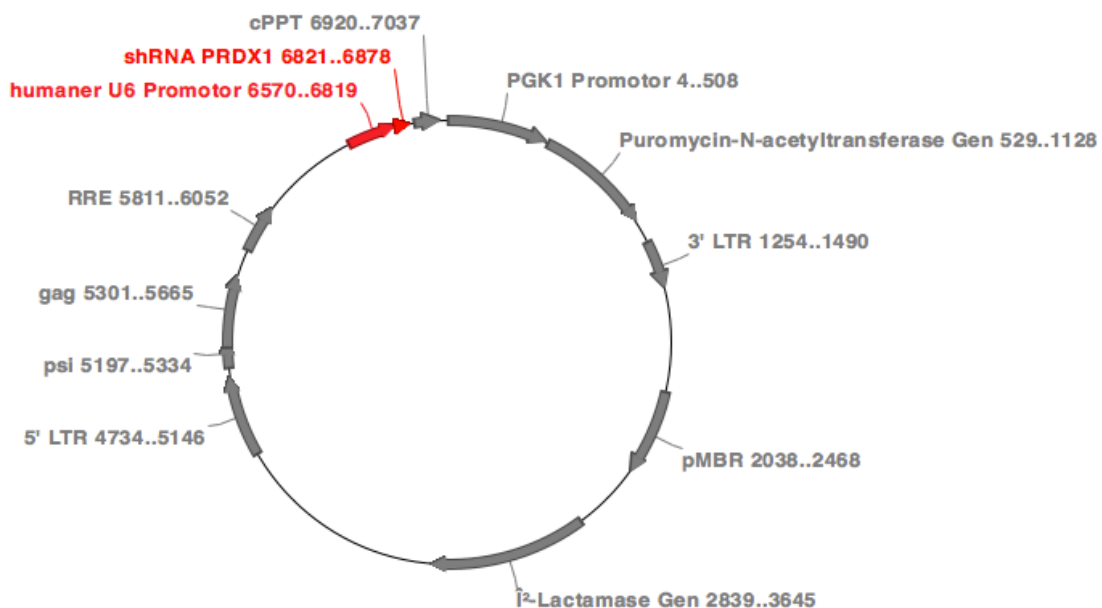
479. Tomita, T., *Interstitial chemotherapy for brain tumors: review*. J Neurooncol, 1991. **10**(1): p. 57-74.
480. Brem, H., et al., *Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group*. Lancet, 1995. **345**(8956): p. 1008-12.
481. Cao, X. and M.S. Schoichet, *Delivering neuroactive molecules from biodegradable microspheres for application in central nervous system disorders*. Biomaterials, 1999. **20**(4): p. 329-39.
482. Groothuis, D.R., *The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery*. Neuro Oncol, 2000. **2**(1): p. 45-59.
483. Westphal, M., et al., *A phase 3 trial of local chemotherapy with biodegradable carmustine (BCNU) wafers (Gliadel wafers) in patients with primary malignant glioma*. Neuro Oncol, 2003. **5**(2): p. 79-88.
484. Buonerba, C., et al., *A comprehensive outlook on intracerebral therapy of malignant gliomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2011. **80**(1): p. 54-68.
485. Fung, L.K., et al., *Pharmacokinetics of interstitial delivery of carmustine, 4-hydroperoxycyclophosphamide, and paclitaxel from a biodegradable polymer implant in the monkey brain*. Cancer Res, 1998. **58**(4): p. 672-84.
486. Bidros, D.S. and M.A. Vogelbaum, *Novel drug delivery strategies in neuro-oncology*. Neurotherapeutics, 2009. **6**(3): p. 539-46.
487. Kesari, S., *Understanding glioblastoma tumor biology: the potential to improve current diagnosis and treatments*. Semin Oncol, 2011. **38 Suppl 4**: p. S2-10.
488. Westphal, M. and K. Lamszus, *The neurobiology of gliomas: from cell biology to the development of therapeutic approaches*. Nat Rev Neurosci, 2011. **12**(9): p. 495-508.
489. Chittiboina, P., et al., *Magnetic resonance imaging properties of convective delivery in diffuse intrinsic pontine gliomas*. J Neurosurg Pediatr, 2014. **13**(3): p. 276-82.
490. Suzuki, A., et al., *Analysis of biodistribution of intracranially infused radiolabeled interleukin-13 receptor-targeted immunotoxin IL-13PE by SPECT/CT in an orthotopic mouse model of human glioma*. J Nucl Med, 2014. **55**(8): p. 1323-9.
491. Lonser, R.R., et al., *Real-time image-guided direct convective perfusion of intrinsic brainstem lesions. Technical note*. J Neurosurg, 2007. **107**(1): p. 190-7.
492. Yamashita, Y., et al., *Convection-enhanced delivery of a topoisomerase I inhibitor (nanoliposomal topotecan) and a topoisomerase II inhibitor (pegylated liposomal doxorubicin) in intracranial brain tumor xenografts*. Neuro Oncol, 2007. **9**(1): p. 20-8.
493. Weller, M., et al., *Combined 1p/19q loss in oligodendroglial tumors: predictive or prognostic biomarker?* Clin Cancer Res, 2007. **13**(23): p. 6933-7.

## Anhänge

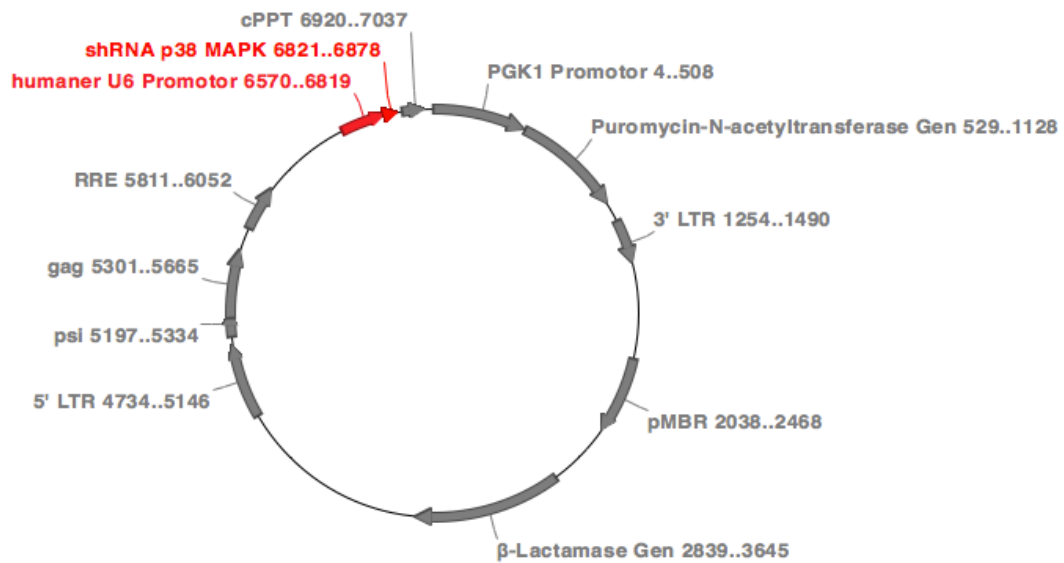
Die Plasmidkarten der kommerziell und selbsthergestellten Plasmide sind im Folgenden aufgeführt. Die DNA Sequenzen, die zum Beispiel für die Selektion und Transkription notwendig sind, sind in grau gehalten, während die Sequenzen der eingebrachten DNA Fragmente rot sind. Resistenzgene sind für die Selektion der Bakterien das  $\beta$ -Lactamase Gen und für die Selektion infizierter Säugerzellen das Puromycin-N-acetyltransferase Gen. Das pLVX-PRDX1 Plasmid wurde kommerziell auf der Zentraleinheit *Genomics & Proteomics Core Facilities* des DKFZs bezogen und diente als Grundlage für die Mutationskonstrukte, die durch das QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit synthetisiert wurden.



Das pLKO-shPRDX1 Plasmid wurde für die Reduktion von PRDX1 verwendet und von Sigma-Aldrich Co. LLC. (St. Louis USA) bezogen. Hierbei handelt es sich um die von L. Dittmann und Kollegen verwendete Sequenz (TRCN0000029511).



Das pLKO-sh*MAPK14* Plasmid wurde für die Reduktion von p38 MAPK verwendet und durch das Einbringen der shRNA gegen *MAPK14* (p38 MAPK; TRCN0000010052) in einen pLKO Plasmid hergestellt.



## Wissenschaftliche Beiträge

### Doktorarbeit

#### Poster

Anika Simon, Elisa Hoffmann, Julia Bode, Rakesh Sharma, Peter Wirthschaft, Nicolas Dross, Christel Herold-Mende, Wolfgang Wick, Björn Tews; Loss of PRDX1 is not only a prognostic marker, but also mediates glioma cell invasion; 4. Heidelberg Forum for Young Life Scientist (2015)

Anika Simon, Peter Wirthschaft, Nicolas Dross, Daria Ezerina, Ulrike Engel, Tobias Dick, Christel Herold-Mende, Björn Tews; Loss of PRDX1 expression mediates glioma chemosensitivity as well as reduced invasion; DKFZ PhD Retreat 2014 (Weil der Stadt)

### Masterarbeit

#### Eingereichte Publikationen

Fabian Wirth, Luka Kulic, Jordan McAfoose, Claudia Späni, Anika Simon, Marcel Maier, Fabio Montrasio, Jan Grimm, Roger M. Nitsch and Tobias Welt; Targeting of misfolded hippocampal SOD1 restores cognitive deficits in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS); Acta Neuropathologica, under revision

#### Poster

Roberto Fiorelli, Anika Simon and Olivier Raineteau; The adult spinal cord central canal harbors a population of GFAP-expressing neural stem cells; ZNZ Meeting (ETH Zürich) 2012

Fabian Wirth, Anika Simon, Jordan McAfoose, Claudia Späni, Daniel Preisig, Rebecca Derungs, Luka Kulic, Roger M Nitsch and Tobias Welt; Characterization of hippocampal SOD1 pathology and its association with cognitive deficits in an animal model of amyotrophic lateral sclerosis (ALS); ZNZ Meeting (ETH Zürich) 2012